THESES

presentees

A LA FACULTE DES SCIENCES

DE L'UNIVERSITE DE PARIS

pour obtenir

le titre de Docteur de l'universite

(mention Sciences)

par

Paul ROBEL

1re These-METABOLISME DE GLUCURONIDES D'ANDROGENES

2e These-Propositions donnees par la Faculte

Soutenue le 11-12-67 devant la commission d'examen

President A.Jost

Examinateurs H.Clauser

E.E.Baulieu

THESES

presentees

A LA FACULTE DES SCIENCES

DE L'UNIVERSITE DE PARIS

pour obtenir

le titre de Docteur de l'universite

(mention Sciences)

par

Paul ROBEL

1re These-METABOLISME DE GLUCURONIDES D'ANDROGENES

2e These-Propositions donnees par la Faculte

Soutenue le 11-12-67 devant la commission d'examen

President A.Jost

Examinateurs H.Clauser

E.E.Baulieu

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITE DE PARIS

FACULTE DES SCIENCES DE PARIS

Janvier 1967 PROFESSEURS

Le Doyen .....M. ZAMANSKY

GRASSE	T	Evolution des êtres organisés
PREVOST	T	Chimie organique
WYART	T	Mineralogie et cristallographie
TEISSIER	T	Zoologie
AUGER	T	Physique quantique et relativité
MONNIER	T	Physiologie générale
PIVETEAU	T	Paléontologie
ROCARD	T	Physique E.N.S
CARTAN	T	Mathématiques E.N.S
LAFFITTE	T	Chimie générale
N...	T	Géométrie supérieure
COULOMB	T	Physique du globe
CHRETIEN	T	Chimie minérale
BOCQUET	T	Zoologie
KASTLER	T	Physique E.N.S
EPHRUSSI	T	Génétique
GAUTHERET	T	Biologie végétale C.P.E.M
LUCAS R.	T	Recherches physiques
THOMAS A.	T	Biologie
MORAND	T	Physique enseignement
SOLEILLET	T	Physique C.P.E.M
FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides

UNIV. LEEDS PUBL.

DRACH	T	Biologie maritime
QUENEY	T	Météorologie et dynamique de l'atmosphere
GALLIEN	T	Embryologie
Melle CAUCHOIS	T	Chimie physique
THELLIER	T	Physique du globe
PONCIN	T	Mécanique générale
DUBREIL	T	Arithmétique et théorie des nombres
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée
CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire
CUVILLIER	T	Micropaléontologie
TRILLAT		Microscopie et diffraction électronique
WIEMANN	T	Chimie organique et structurale
VASSY	T	Physique de l'atmosphere
DESTOUCHES	T	Théorie physique
AMIEL	T	Chimie générale
J.P. MATHIEU	T	Physique optique
COUTEAUX	T	Cytologie
CHOQUET	T	Théorie des fonctions et topologie
FELDMANN	T	Biologie végétale marine
JOST	T	Physiologie comparée
FORTET	T	Calcul des probabilités et physique mathématique
SCHWARTZ	T	Calcul différentiel et intégral
CHOUARD	T	Physiologie végétale
MALAVARD	T	Aviation (technique aéronautique)
BRELOT	T	Analyse supérieure
EICHHORN	T	Botanique
BENARD	T	Chimie appliquée
DUGUE	T	Stétistique mathématique
SOULAIRAC	T	Psychophysiologie
ULRICH	T	Physiologie végétale appliquée
KIRRMANN	T	Théories chimiques
CHADEFAUD	T	Botanique
Melle LE BRETON	T	Physiologie de la nutrition

LELONG	T	Application de l'analyse à la géométrie
DEVILLERS	T	Anatomie comparée
EHRESMANN	T	Topologie algébrique
FRANÇON	T	Physique S. P. C. N
GLANGEAUD	T	Géographie physique, géologie dynamique
GODEMENT	T	Mathématiques M. G. P
PISOT	T	Technique mathématique de la physique
ROCH	T	Géologie
SCHATZMANN	T	Astrophysique
TERMIER	T	Géologie générale
ZAMANSKY	T	Mathématiques générales
LENNUIER	T	Physique M. G. P
ROUTHIER	T	Géologie appliquée
Mme TONNELAT	T	Physique théorique
DIXMIER	T	Mathématiques M. P. C
SOUCHAY	T	Chimie générale
AIGRAIN	T	Electrotechnique
BRUSSET	T	Chimie systématique
LEVY	T	Physique théorique des hautes énergies
Mme CHAIX	T	Chimie biologique
Mme HUREL - PY	T	Biologie végétale C. P. E. M
PANNETIER	T	Chimie générale I
NORMANT	T	Synthèse organique
YVON	T	Théories physiques
COTTE	T	Physique électricité
DUBOIS J. E	T	Chimie organique physique
LAMOTTE	T	Zoologie E. N. S
OLMER	T	Energétique générale
GAUTHIER	T	Mécanique appliquée
BARCHEWITZ	T	Chimie physique
BROSSEL	T	Physique atomique
BUSER	T	Physiologie comparée
CAMUS	T	Physiologie végétale
CURIEN	T	Minéralogie et cristallographie
POSSOMPES	T	Zoologie

PULLMANN	T	Chimie quantique
TEILLAC	T	Physique nucléaire et radioactivité
VILLE	T	Econométrie
FREYMANN	T	Recherches physiques
ROLLET	T	Chimie minérale
Melle JOSIEN	T	Chimie S. P. C. N
CHEVALLEY	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes
GERMAIN	T	Mécanique théorique des fluides
LUCAS G.	T	Géologie
ALLARD	T	Chimie physique
BERTHELOT	T	Physique des particules fondamentales
BRICARD	T	Météorologie
Mme ALBE - FESSARD	T	Psychophysiologie
JULIA	T	Etude des molécules naturelles complexes
MAGAT	T	Physico-chimie des rayonnements
MONOD	T	Chimie du métabolisme
BRUN	T	Mécanique des fluides I
Mme DUBREIL	T	Mathématiques (Agrégation)
Mme LELONG	T	Mathématiques II E. N. S
BELLAIR	T	Géologie S. P. C. N
BOUISSIERES	T	Radiochimie
Mme COUTURE	T	Thermidynamique et mécanique
FRANC		Biologie animale C. P. E. M
SCHNELL	T	Botanique tropicale
STOLKOWSKI	T	Physiologie générale
ACHER	T	Chimie biologique
BAUDOIN	T	Biologie animale C. P. E. M
BEAUMONT		Biologie animale S. P. C. N
BLAMONT		Géophysique ionosphere
BOUREAU	T	Botanique
CURIE D		Physique M. G. P
DURAND DELGA	T	Géologie
HELLER	T	Physiologie végétale
TORTRAT	T	Calcul des probabilités
CAILLEUX	T	Géologie S. P. C. N

MAGNAN	T	Physique électricité
DAUDEL	T	Mécanique ondulatoire
Mme CHOQUET BRUHAT	T	Mécanique analytique et mécanique céleste
Melle VEIL	T	Physiologie générale
LWOFF	T	Microbiologie
SIESTRUNCK	T	Mécanique physique et expérimentale
CABANNES	T	Mécanique théorique
CAIRE	T	Géographie physique et géologie dynamique
COMOLET	T	Mécanique des fluides
DELLOUE	T	Physique de l'exosphère
HOUILLON	T	Biologie animale
OLIVIER	T	Anthropologie
SAMUEL	T	Mathématiques (E.N.S. Jeunes filles)
de POSSEL	T	Analyse numérique
CHARLOT	T	Chimie analytique
CHATELET	T	Chimie C.P.E.M
MATTLER	T	Physique S.P.C.N
AUBOUIN	T	Géologie
Mme BENOIT - GUEUTAL	T	Physique nucléaire et radioactivité
BOUGIS	T	Biologie végétale marine Villefranche s/ mer
RIGAUDY	T	Chimie S.P.C.N
COLLONGUES	T	Chimie appliquée
DUBERT		Biochimie
NOZIERES	T	Physique fondamentale
CADIOT		Chimie organique
IVANOFF	T	Océanographie physique
FRANCOIS		Zoologie
TALBOT	T	Génie chimique
Mme NOUGAREDE		Botanique
BRUHAT	T	Mathématiques M.P.C
FOURNET		Electricité générale
DEHEUVELS	T	Mathématiques propédeutique
FURON	T	Géologie S.P.C.N
Mme GANS	T	Génétique
GENEVES		Biologie végétale C.P.E.M

HUPE	T	Pétrographie
HOLLANDE	T	Biologie générale
LIONS	T	Analyse numérique
MAITTE	T	Chimie organique
NICOLAS		Géologie appliquée
PANIGEL		Biologie générale
RAVIER	T	Pétrographie
MOREL F.	T	Physiologie comparée
ROSEAU	T	Mécanique théorique des fluides
ROUBINE	T	Electronique E.S.E
SILBER	T	Chimie C.P.E.M
UEBERSFELD	T	Electronique
THIRY	T	Mécanique céleste
ABELES	T	Physique S.P.C.N
AMAT	T	Thermodynamique
BALKANSKI		Physique M.P.C 1
LE CORRE	T	Electricité
NATAF	T	Physique nucléaire et radioactivité
ECHALIER		Biologie animale C.P.E.M
BARRAUD	T	Physique C.P.E.M
DARS		Géologie structurale et appliquée
CAMEFORT		Botanique (Agrégation)
VICHNIEWSKY	T	Mécanique industrielle
SIGWALT		Chimie S.P.C.N
BLAQUIERE		Automatique
BARUCH		Physique propédeutique
ARNOUS	T	Physique théorique
SLONIMSKI		Génétique
MALLIAVIN	T	Mathématiques propédeutique
GAUDEMAR		Chimie propédeutique
BROUSSE	T	Mécanique théorique
ROSCH	T	Astronomie
GUY	T	Physique expérimentale
LAZARD	T	Mathématiques M.P.C
MOREL P.	T	Physique M.P.C
ARSAC		Progammation

LEFEBVRE	T	Chimie M. P. C
BOK		Physique fondamentale
CHAPEVILLE		Biochimie
BENOIT		Physique C. P. E. M
RIO		Physique C. P. E. M
JAUZEIN		Géologie E. N. S
PROVOST G.		Biologie cellulaire
FAVARD P.		Biologie animale C. P. E. M
Mme CHARNIAUX - COTTON		Evolution des êtres organisés
Melle FICINI		Chimie C. P. E. M
LEQUEUX		Astronomie
COHEN TANNOUDJI		Physique atomique
HERVE	T	Mathématiques
Mme PECKER - WIMEL	T	Astrophysique
TAVERNIER		Physique P. C
DURAND Michel		Biologie animale S. P. C. N
PASCAUD		Physiologie
Mme PETIT		Biologie animale C. P. E. M
CAGNAC		Electricité
FALK - VAIRANT		Physique nucléaire
KRASNER	T	Mathématiques
BENSECRI	T	Statistiques
VINH MAU		Physique M. G. P
DUQUESNES		Physique C. P. E. M
SCHUTZENBERGER	T	Programmation
TREMILLON		Chimie M. P. C
FAYARD		Chimie M. P. C
BUVET		Chimie C. P. E. M
AUTHIER		Minéralogie et cristallographie
BONNEFILLE		Electrotechnique
Mme PUISEUX DAO		Biologie végétale
BERGER	T	Géométrie supérieure
Melle LIBERMANN	T	Mathématiques
DEDONDER	T	Biologie cellulaire
DUFOUR	T	Electronique I. U. T
SCHAAL		Chimie C. P. E. M
BAUCHOT		Anatomie comparée
LANCE		BV C. P. E. M

GIRAUD	Botanique E.N.S
HULIN	Physique P.C
VIGIER	Génétique
GUERN	Biologie végétale
SLODZIAN	Physique C.P.E.M
LACOMBE	Logique mathématique
TAVLITZKI	Biologie cellulaire
ARVIEU	Physique C.P.E.M
TAXI	BA C.P.E.M
COLLENOT	BA C.P.E.M
BASSELIER	Chimie propédeutique
BADOUAL	Electronique I. UT.

Le Secrétaire Général :

R. POULLAIN

METABOLISME

DE GLUCURONIDES D'ANDROGENES

I N T R O D U C T I O N

Les hormones stéroides sont synthétisées dans les glandes endocrines et sécrétées, elles circulent dans le sang, atteignent des organes-cibles où elles exercent leur action biologique, puis atteignent des organes métaboliques (principalement le foie) ; elles sont alors transformées en métabolites et ceux-ci sont conjugués à l'acide glucuronique ou à l'acide sulfurique, puis excrétés. La conjugaison apparaît dans cette conception comme un processus ultime de "détoxication", lié à l'hydrosolubilité et à l'épuration rénale très rapide (13, 38) des conjugués.

Depuis quelques années une série de découvertes ont conduit à reconsidérer cette conception classique. Elles concernent principalement le domaine des sulfates de stéroides. En premier lieu il a été montré par Baulieu (1) et confirmé par de nombreux auteurs, en particulier par l'école de Lieberman (61), que le sulfate de déhydroépiandrostérone(o) est normalement sécrété par la surrénale de l'homme. La synthèse de sulfates-^{35}S de stéroides-^{3}H a permis de montrer <u>in vivo</u> la transformation d'un sulfate-^{35}S de stéroide-^{3}H en un autre sulfate-^{35}S de stéroide-^{3}H tant au niveau de la

---

(o) : Voir la liste des appellations courantes et abréviations.

Liste des appellations courantes et abréviations

Testostérone (T) : 17β-hydroxy-4-androstène-3-one.

Déhydroépiandrostérone (D) : 3β-hydroxy-5-androstène-17-one.

Androstènedione (Δ) : 4-androstène-3,17-dione.

5β-androstérone (3α-OH-5β-A, 5β-A) : 3α-hydroxy-5β-androstane-17-one.

Androstérone (3α-OH-5α-A, A) : 3α-hydroxy-5α-androstane-17-one.

Epiandrostérone (3β-OH-5α-A, I) : 3β-hydroxy-5α-androstane-17-one.

3β-hydroxy-5β-androstane-17-one (3β-OH-5β-A).

5β-androstanolone : 17β-hydroxy-5β-androstane-3-one.

5-androstènediol (Δ5-diol) : 5-androstène-3β,17β-diol.

5β-androstanediol (5β-Adiol, 5β-AOH) : 5β-androstane-3α,17β-diol.

Androstanediol (Adiol, AOH) : 5α-androstane-3α,17β-diol.

Sulfate (S) : ester sulfate.

Glucuronide (G) : β-D-glucopyranuronoside.

Méthyl-triacétyl-glucuronide (G-Ac_3-Me) : méthyl-2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucopyranuronoside.

Méthyl-tétracétyl-glucuronide de 5β-androstanediol (G-5β-AOH-Ac_4-Me) : 3α-acétoxy-5β-androstane-17β-yl méthyl-2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucopyranuronoside.

3 cétostéroide-Δ4-deshydrogénase : 3 cétostéroide-Δ4-oxydoréductase (E.C. : 1.3.99.5).

3α-hydroxystéroide deshydrogenase : 3α-hydroxystéroide NAD (P) oxydoréductase (E.C. : 1.1.1.50).

17β-hydroxystéroide deshydrogenase : 17β-hydroxystéroide NAD (P) oxydoréductase (E.C. : 1.1.1.51).

biosynthèse que du métabolisme (2, 17), ce que nous désignerons sous le terme de métabolisme direct d'un stéroide conjugué ; d'autre part, les métabolites peuvent être formés indirectement après la rupture de la conjugaison (3, 49, 59).

Dans le domaine des glucuronides de stéroides ces deux types de processus métaboliques n'étaient pas jusqu'à présent connus. Or il a été démontré récemment que certaines hormones stéroides, nommément la testostérone et la déhydroépiandrostérone, sont, en dehors de leur transformation en métabolites, partiellement conjugués en tant que telles à l'acide glucuronique.

Le glucuronide de testostérone est présent dans l'urine (18, 52) et dans le plasma (15) ; il est formé dans le foie, comme l'ont montré de nombreuses expériences in vitro (26). Il circule dans le plasma avec un concentration sensiblement égale à celle de la testostérone libre (15). Il est excrété dans l'urine où l'on retrouve 0,2 à 1 p.cent de la testostérone produite (ou injectée) dans l'organisme. La mesure du glucuronide de testostérone est actuellement largement utilisée en physio-pathologie humaine. Il était important de juger si le glucuronide de testostérone, étant un glucuronide d'hormone et non un glucuronide de métabolite inactif, ne pouvait pas représenter une forme de transport : circulant sous une forme biologiquement inactive en raison de sa conjugaison à l'acide glucuronique, la testostérone pourrait être libérée au niveau de récepteurs privilégiés par l'action d'une β-glucuronidase tissulaire, et exercerait ainsi localement son action androgénique.

Le glucuronide de déhydroépiandrostérone a été mis en évidence dans les urines de sujets normaux après ingestion de doses importantes de déhydroépiandrostérone (51), d'une femme porteuse de tumeur surrénale (9), et dans les urines de sujets normaux (38, 57). L'intérêt de ce métabolite réside dans le fait qu'il permet de mesurer les taux de production, de sécrétion, et d'interconversion métabolique(o) de la déhydroépiandrostérone et du sulfate de déhydroépiandrostérone *in vivo* ; il suffit d'injecter par voie intraveineuse le sulfate de déhydroépiandrostérone et la déhydroépiandrostérone marqués respectivement par le ^{3}H et le ^{14}C, et d'analyser l'activité spécifique du glucuronide et du sulfate de déhydroépiandrostérone urinaire (31, 61). La validité de tels calculs pourrait être remise en cause par un "métabolisme ultérieur" du glucuronide de déhydroépiandrostérone formé, si ce dernier pouvait à son tour être converti en sulfate de déhydroépiandrostérone.

Au moment où nous abordions ce travail, peu de choses étaient connues sur le métabolisme des glucuronides de stéroïdes. Kellie, dans une courte note (36), signalait en 1961 une augmentation de l'androstérone et de la 5β-androstérone urinaires après la prise de fortes doses de glucuronide de déhydroépiandrostérone par la bouche ; mais on ne pouvait dans ce cas exclure une hydrolyse dans la lumière intestinale. Ultérieurement, le même auteur confirmait ses résultats en administrant de fortes doses de glucuronide de déhydroépi-

---

(o) : Pour la définition de ces notions voir le Chapitre I, 4.

androstérone non marqué par voie intraveineuse (22). Cependant l'emploi de doses massives non physiologiques laissait planer un doute sur la signification de ces résultats et imposait l'emploi de glucuronides de stéroides marqués par les radioéléments. Un tel travail a été réalisé récemment par Siiteri et Lieberman, qui ont montré que le glucuronide d'androstérone-^{3}H injecté par voie intraveineuse est totalement excrété, inchangé, dans l'urine (56) ; une constatation analogue a été faite par Underwood et Tait en ce qui concerne le glucuronide d'aldostérone (60). Par contre, Diczfalusy et coll.ont montré, postérieurement à l'achèvement du présent travail, que le 16-glucuronide d'oestradiol était partiellement converti en 3-glucuronide et 3-sulfate d'oestradiol, démontrant un processus d'hydrolyse et de reconjugaison du glucuronide injecté (29).

Pour la réalisation de ce travail, il convenait de disposer de glucuronides de stéroides marqués d'activité spécifique suffisamment élevée pour opérer dans des conditions physiologiques. Il a fallu adapter les méthodes classiques de synthèse des glucuronides à l'échelle de 10 micromoles. Nous avons été amenés à mettre au point de nouvelles méthodes de chromatographie des glucuronides de stéroides et de leurs dérivés acétylés et méthylés, à l'aide du système de gradient de polarité. Les critères classiques de structure chimique et de pureté des composés synthétisés (analyse élémentaire, spectrographie infrarouge, pouvoir rotatoire, en particulier) ne pouvant être employés, il a fallu recourir à d'autres méthodes, en particulier à la chromatographie de partage et d'adsorption sur colonne, à la formation de dérivés, et à la preuve de l'homogénéité radiochimique obtenue à l'aide de la cristallisa-

tion après dilution isotopique. L'emploi d'un compteur à scintillation liquide à plusieurs canaux permet la mise en oeuvre de ces diverses techniques.

Ce travail sera divisé en six chapitres :

I - Méthodes et Techniques.
II - Structure du glucuronide de testostérone urinaire.
III - Métabolisme du glucuronide de testostérone-^{14}C ou -^{3}H.
IV - Métabolisme du glucuronide-^{14}C de testostérone-^{3}H.
V - Métabolisme du glucuronide de déhydroépiandrostérone-^{3}H.
VI - Métabolisme du glucuronide d'épiandrostérone-^{3}H.

C H A P I T R E .I.

METHODES ET TECHNIQUES

1 - Recueil, extraction, hydrolyse, purification préliminaire des urines.

A partir de l'injection du ou des composés radioactifs, les urines ont été recueillies en règle pendant quatre jours dans des bocaux contenant de l'acide mercurithiosalycilique comme antiseptique et conservées en chambre froide jusqu'à l'extraction.

Lorsque la purification des métabolites urinaires devait être réalisée à partir des conjugués eux-mêmes, la méthode de Edwards et Kellie a été utilisée (24) : les urines sont additionnées de 50 p.cent de sulfate d'ammonium (poids : volume) et extraites par le mélange éther éthylique - éthanol (3:1 v/v). L'extrait est repris par l'éthanol absolu et le sulfate d'ammonium est précipité à froid à plusieurs reprises. La méthode de McKenna et Norymberski a été utilisée pour isoler les sulfates de stéroides : elle consiste à les convertir en sulfates de pyridinium et de stéroide, qui deviennent extractibles par le chloroforme, alors que les glucuronides de stéroides demeurent dans la phase aqueuse (45).

Dans la plupart des cas, les urines ont été traitées de façon à obtenir séparément et quantitativement les stéroides sulfo- et glucuro-conjugués (10); les urines ont été additionnées de 20 p.cent de chlorure de sodium et acidifiées à pH 1; les stéroides conjugués ont été extraits 3 fois une heure par l'acétate d'éthyle (v/v) à l'aide d'un extracteur rotatif; l'extrait obtenu a été laissé une nuit à 37° de manière à obtenir la solvolyse des sulfates de stéroides (16). Les glucuronides ont été réextraits de l'acétate d'éthyle par lavage à la soude et à l'eau, et une hydrolyse enzymatique a été réalisée à pH 7 par le suc digestif d'Helix Pomatia L. Nous conserverons l'appellation "glucuronide" ou "sulfate" pour les métabolites excrétés dans les urines sous la forme correspondante, et dont l'analyse a été réalisée après l'hydrolyse sélective décrite. La fraction "sulfate" pourrait contenir des stéroides libres, mais nous avons vérifié préalablement et au cours de l'expérience n° 3 décrite au Chapitre III que l'extraction par le dichlorométhane des stéroides libres ne contient qu'une quantité insignifiante de radioactivité (moins de 0,1 p.cent).

Les stéroides des fractions "sulfate" et "glucuronide" ont été systématiquement séparés en fractions cétonique et non-cétonique par le réactif T de Girard, qui a la particularité de donner avec les cétones, en milieu acide, un composé hydrosoluble.

2 - Systèmes de chromatographie.

Le recours à la chromatographie de partage sur colonne de célite a été d'un grand secours au cours de ces expériences. La préparation des colonnes est facilitée par le procédé à sec de C. Pidacks, repris par Siiteri (54) : dans un sac plastique, la célite est pétrie soigneusement après addition de phase stationnaire (1:2 v/p); la célite est alors imprégnée de façon homogène et peut être tassée dans la colonne à l'aide d'un agitateur. La colonne est prête à l'emploi en quelques minutes.

La composition des phases a été établie en fonction du coefficient de partage des stéroides étudiés, du volume de phase stationnaire (s) imprégnant la célite et du volume de phase mobile retenu sur la hauteur de la colonne (volume de rétention, V.R.).

La formule suivante a été appliquée :

$$n = k \times \frac{s}{V.R.}$$

où n = nombre de volumes de rétention nécessaires pour éluer le stéroide.

k = coefficient de partage (phase stationnaire/phase mobile).

Les systèmes suivants ont été utilisés :

Stéroides libres

A : Chromatographie sur colonne d'alumine (Woelm degré 1) hydratée à 4 p.cent, avec gradient d'élution selon une modification de l'appareil de Lakshmanan et Lieberman (41), pour les stéroides cétoniques.

B : Une modification de la méthode précédente, employant une alumine hydratée à 6 p.cent et une plus forte teneur d'éthanol dans le benzène, pour les stéroides non-cétoniques (6).

C : Chromatographie sur couche mince de gel de silice dans le système dichloroéthane - benzène (1:1) (6).

D : Chromatographie de partage sur colonne de célite 535 (John Manville) dans les systèmes de solvants inspirés de Siiteri (54); sauf indication contraire les proportions sont : isooctane - acétate d'éthyle - méthanol - eau (8:3:9:1).

E : Chromatographie de partage sur colonne de célite avec gradient linéaire d'élution; l'éthylèneglycol est utilisé comme phase stationnaire (55); pour une colonne de 10 grammes de célite, le cylindre mélangeur de 6 cm de diamètre, contient 250 ml d'isooctane, le cylindre donneur contient 190 ml d'acétate d'éthyle. Le mélange des solvants dans le

cylindre mélangeur, est assuré par un agitateur magnétique, et s'opère par gravité (Fig. 0.). Ce système est très reproductible. Il est plus résolutif que la chromatographie de partage simple, les pics de stéroides sont plus aigüs, même dans le cas des composés polaires, élués au-delà du 10^{e} volume de rétention.

F : Chromatographie sur papier (Whatman n° 1) dans le système ligroïne - propanediol pour les 17-cétostéroides et la testostérone (50).

G : Chromatographie sur papier dans le système cyclohexane - benzène (1:1) - propanediol pour les stéroides non-cétoniques.

P : Chromatographie de partage sur colonne de 2,5 grammes de silice - célite (4:1) préparée dans l'hexane. Elution par les mélanges suivants (fractions de 20 ml) : hexane; hexane - benzène (1:1); benzène; benzène - acétate d'éthyle (95:5) (90:10) (70:30) (50:50) (50:50); acétate d'éthyle; méthanol.

Stéroides glucuroconjugués.

I : Chromatographie d'adsorption sur colonne de Florisil activé de 400 grammes, selon Baulieu et Emiliozzi (5), qui sépare les stéroides libres, sulfoconjugués et glucuroconjugués (Tableau I).

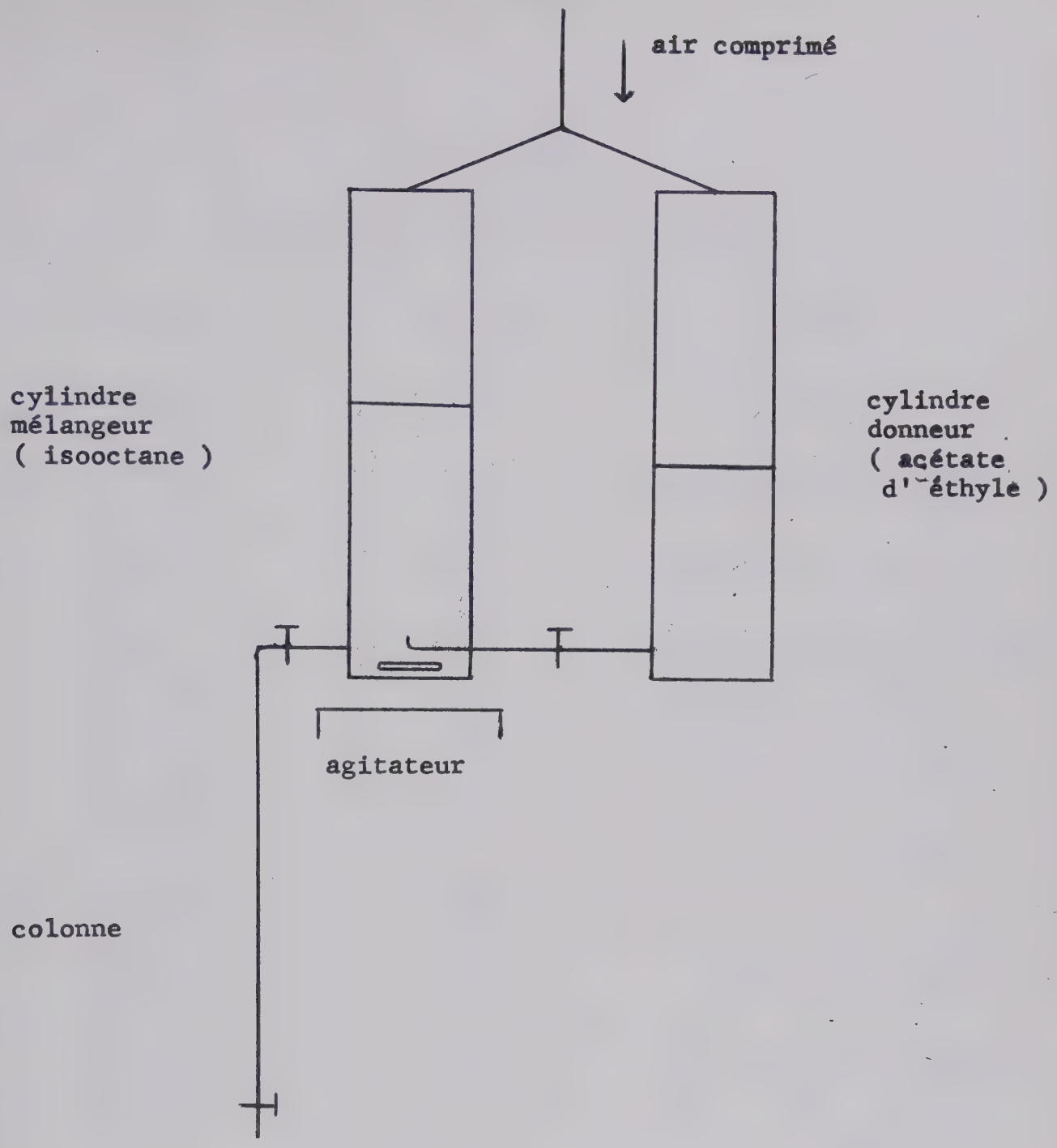


Figure .0.

Appareil pour gradient linéaire de polarité.

T A B L E A U .I.

CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE FLORISIL

	Solvants	(v/v)	Stéroides
1	Benzène Méthanol	98 2	Fixation
2	Benzène Acétone	80 20	Stéroides libres
3	Benzène Acétone	50 50	
4	Acétone		
5	Acétone Méthanol	95 5	Monosulfates
6	Acétone Méthanol	90 10	Disulfates
7	Acétone Méthanol	80 20	
8	Acétone Méthanol	70 30	
9	Acétone Méthanol	50 50	Monoglucuronides
10	Acétone Méthanol	25 75	Conjugués polaires
11	Méthanol		

J : Chromatographie de partage sur colonne de célite 535 à l'aide des systèmes utilisés par Siiteri (54) pour les glucuronides de C-19 stéroides :

a) Isooctane - t-butanol - acide acétique - eau (200:550:125:500)

b) Isooctane - t-butanol - ammoniaque molaire (100:300:250)

K : Chromatographie de partage sur colonne de célite avec gradient linéaire d'élution :

Phase stationnaire : acide acétique - eau (65:250)
Première phase mobile : isooctane - t-butanol (200:200)
Deuxième phase mobile : isooctane - t-butanol (40:200)

Pour une colonne de célite de 20 grammes le volume de chaque phase mobile utilisée est de 220 ml. La figure 1 donne un exemple de séparation des glucuronides d'androstérone, de 5β-androstérone et de testostérone réalisée à l'aide de cette technique.

L : Chromatographie de partage sur colonne de célite avec gradient linéaire d'élution :

Phase stationnaire : acide acétique - eau (20:180)
Première phase mobile : isooctane - acétate d'éthyle (100:100)
Deuxième phase mobile : acétate d'éthyle.

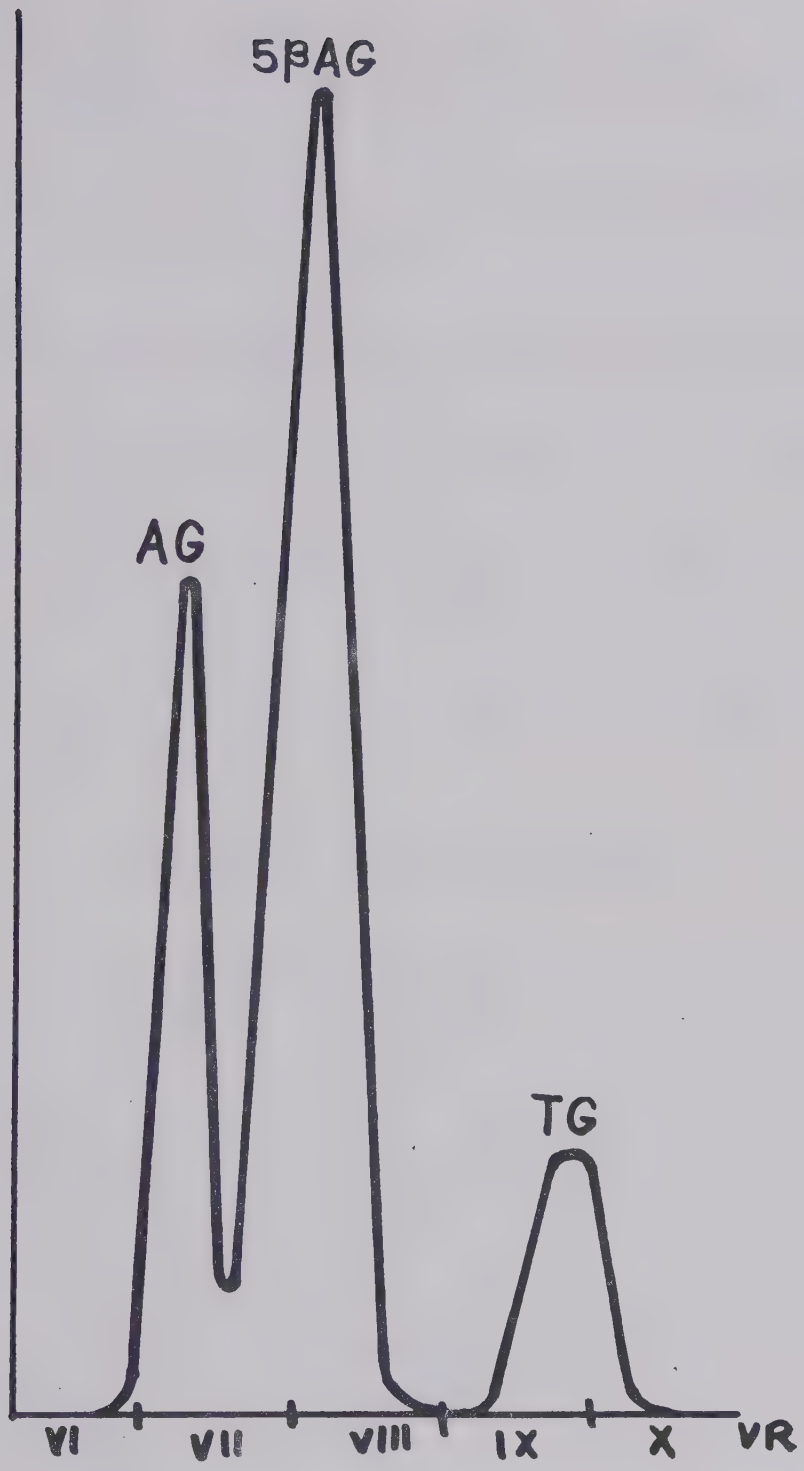


Figure 1.

Séparation des glucuronides d'androstérone (AG), de 5β-androstérone (5βAG) et de testostérone (TG) par chromatographie de partage avec gradient d'élution (système K).

M : Chromatographie de partage sur papier dans le système B20-1 (9).

N : Chromatographie de partage sur papier dans le système "isoamylique" (19).

Glucuronides acétylés et méthylés de stéroides.

H : Chromatographie sur couche mince de célite dans le système éther - dichloroéthane (1:2).

O : Chromatographie de partage sur célite dans le système isooctane - éthylèneglycol (20:1).

E : Le système E décrit pour les stéroides libres a également été utilisé.

3 - Détection et identification.

La réaction de Zimmermann a été utilisée pour les 17-cétostéroides et la testostérone, l'absorption à 240 mμ pour la testostérone, la fluorescence ultraviolette après réaction du trichlorure d'antimoine pour les stéroides non-cétoniques. Les dosages ont été dans certains cas réalisés par une microréaction de Zimmermann (14) ou par l'absorption ultraviolette. La spectrophotométrie infrarouge, sur pastille de BrK, avec un spectromètre à double faisceau (Perkin-Elmer 13) a été utilisée pour l'identification de la 5β-androstérone (Expérience 6).

La dilution isotopique avec des composés de référence purs a été pratiquée dans la plupart des expériences. L'identité des activités spécifiques des cristaux lors de deux cristallisations successives, et de l'eau-mère, a été considérée comme une preuve de la nature et de l'homogénéité radiochimique du métabolite envisagé.

Différentes réactions chimiques ont été utilisées pour corroborer ou infirmer la structure chimique des composés isolés. L'acétylation a été utilisée pour les stéroides hydroxylés. La formation d'epoxyde par action d'acide métachloroperbenzoïque a servi à caractériser la présence de double liaison. L'oxydation par le MnO_2 ou la dichlorodicyanoquinone (48) a permis la recherche de composés porteurs d'une fonction alcool allylique.

4 - Comptage et calculs.

Le rayonnement β des émetteurs ^{3}H et ^{14}C utilisés a été mesuré à l'aide d'un spectromètre à scintillation liquide (Packard 3325). En raison de la faible solubilité des glucuronides de stéroides et des métabolites polyhydroxylés dans le mélange scintillant (0,3 p.cent de diphényloxazole et 0,01 p.cent de 1,4-bis-2(4-méthyl-5-phényloxazolyl) benzène (Packard) dans le toluène (Merck), 0,2 ml de méthanol ont été systématiquement ajoutés aux 5 ml de scintillateur utilisés

pour le comptage. Dans certains cas le volume de méthanol a dû être porté à 0,5 ou 1 ml et les résultats ont été corrigés pour l'atténuation produite. La méthode d'Okita (46) pour la mesure simultanée du ^{3}H et du ^{14}C a été simplifiée en utilisant un réglage du spectromètre donnant une mesure directe du ^{14}C. Dans les conditions de double comptage le rendement pour le ^{14}C est de 55 p.cent et pour le ^{3}H de 30 p.cent. Le comptage a été prolongé de façon à obtenir dans tous les cas une erreur inférieure à 5 p.cent. Le rapport $^{14}C/^{3}H$ a toujours été mesuré sur des composés purifiés. Etant donné la grande dispersion des valeurs trouvées dans les divers métabolites isolés, le rapport $^{14}C/^{3}H$ est dans certains cas supérieur à 1, et dans ces cas le résultat n'est qu'approximatif en raison des caractéristiques du double comptage isotopique; il en va de même lorsque le rapport $^{3}H/^{14}C$ est supérieur à 10.

Pour le comptage direct de l'urine, un mélange à base de dioxanne a été utilisé (Dioxanne 1,75 L, toluène 0,25 L, naphtalène 210 g; PPO 6 g, POPOP 0,2 g). Les résultats ont été corrigés pour l'atténuation et la différence de rendement de comptage à l'aide de la méthode du standard interne.

Nous appellerons <u>taux de conversion</u> le pourcentage de la radioactivité injectée recouvré dans le métabolite urinaire considéré. Un coefficient R a été calculé chaque fois que possible : il est défini comme le rapport $^{14}C/^{3}H$ (ou $^{3}H/^{14}C$) d'un métabolite divisé par le rapport $^{14}C/^{3}H$ (ou $^{3}H/^{14}C$) des précurseurs radioactifs injectés. Si l'on admet un modèle

métabolique à deux compartiments du type représenté dans la figure 2, il est évident que le coefficient R représente la contribution respective du précurseur P_1-^{14}C (ou -^{3}H) et du précurseur P_2-^{3}H (ou -^{14}C) correspondant au métabolite considéré, puisque R peut s'écrire :

$$R = \frac{^{14}C \text{ métabolite}/^{14}C \text{ injecté}}{^{3}H \text{ métabolite}/^{3}H \text{ injecté}}$$

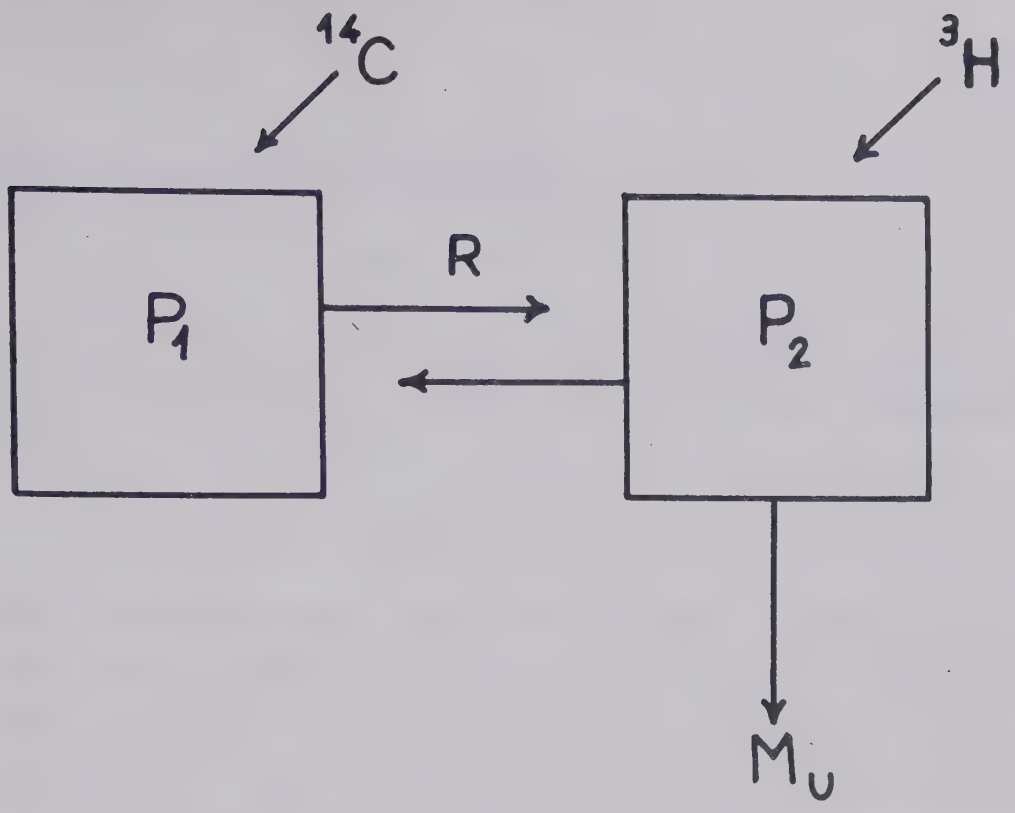
Ce R a la même signification physiologique que le facteur de conversion décrit par Gurpide (32) et utilisé par Tait (34).

Le taux de production a été calculé à partir de l'activité spécifique du glucuronide de stéroide urinaire à l'aide de la classique formule de Pearlman (47)

$$\text{Taux de production (mg/24 H)} = \frac{\text{Radioactivité injectée}}{\text{activité spécifique du métabolite} \times n}$$

où n représente le nombre de jours de recueil d'urine nécessaire pour le recueil complet du métabolite radioactif considéré.

Le taux de "production" (P) ainsi mesuré représente le stéroide secrété par les glandes endocrines ("secrétion" : S) et entrant dans la circulation, auquel s'ajoute le stéroide formé éventuellement dans les organes métaboliques (principalement le foie : "production" hépatique : P_f) et dont une part seulement ressort dans la circulation ($P_{f \rightarrow s}$) le reste étant



P_1 = Premier précurseur

P_2 = Deuxième précurseur

M_u = Métabolite urinaire

$$R = \frac{^{14}C/^{3}H \text{ métabolite}}{^{14}C/^{3}H \text{ injectés}}$$

Figure 2.

Signification physiologique du facteur de conversion (R).

métabolisé et conjugué in situ.

$$P = S + P_f$$

La quantité du stéroide qui a effectivement circulé et qui a pu exercer son activité biologique (P_s) est donnée par la formule :

$$P_s = S + P_{f \rightarrow s}$$

Cette valeur ne peut être calculée par la méthode que nous avons employée. De nombreux critères sont exigibles pour assigner une réalité physiologique à la mesure des taux de production. Ces critères sont maintenant bien connus. Nous aurons l'occasion d'insister sur certains aspects nouveaux qui se dégagent des études métaboliques entreprises.

5 - Synthèse des glucuronides de stéroides radioactifs.

Les stéroides marqués par les radioéléments qui ont été administrés au cours des expériences in vivo ou qui ont servi à la préparation des glucuronides de stéroides radioactifs ont été soigneusement contrôlés. Au moins une chromatographie dans un système de partage ou une chromatographie dans un système d'adsorption a permis de vérifier la polarité et l'homogénéité du stéroide radioactif. La cristallisation après dilution isotopique par le stéroide analytique de référence(o) a toujours été réalisée, et on n'a employé que les stéroides dont la pureté était supérieure à 95 p.cent.

(o) : Ces composés ont été donnés par les établissements Roussel-UCLAF (Pr. Velluz) que nous remercions pour leur générosité.

La méthode de synthèse des glucuronides utilisée reprend les principes de Koenig et Knorr (39) déjà appliqués par Shapiro et Wotiz à la préparation des glucuronides de stéroides (53, 62). Le stéroide hydroxylé est condensé avec le méthyl-1α-bromo-1 déoxy-2,3,4 tri-O-acétyl-D-glucopyranosyluronate (28) en présence de carbonate d'argent.

Le méthyl-triacétyl-glucuronide de stéroide est ensuite saponifié. Il est purifié par chromatographie jusqu'à ce que la dilution isotopique avec le composé de référence préparé par R. Emiliozzi (25) donne une preuve de la pureté radiochimique. Le détail du procédé opératoire sera donné à propos de la synthèse du glucuronide-^{14}C de testostérone-^{3}H.

A - Glucuronide de testostérone-4-^{14}C

L'acétate de testostérone-4-^{14}C a été synthétisé par H. Floch (CEA, 1962, N° 2218). Après saponification par la potasse, la testostérone-4-^{14}C a été purifiée par chromatographie dans les sytèmes A et D. L'activité spécifique était de 28 µcurie/µmole. Par chromatographie sur papier (système F) et dilution isotopique, la pureté a été estimée à plus de 95 p.cent Après passage sur colonne de silica gel (Davison, 100-200 mesh)° préparée dans le benzène et éluée par le mélange benzène - éther (3:1), le produit de condensation de la testostérone-4-^{14}C et du dérivé bromé a été chromatographié à deux reprises dans le

---

°: 60 g de silica gel sont utilisés pour réaliser une colonne de 30 cm de hauteur et 2,5 cm de diamètre. Une couche de célite de 2 grammes est placée au sommet de la colonne de façon à retenir les sels d'argent colloïdaux.

système H de façon à séparer la testostérone libre n'ayant pas réagi. Bien que la dilution isotopique ait montré que le glucuronide de testostérone-^{14}C triacétylé ester méthylique soit encore très impur, la saponification par la soude méthanolique a été réalisée. Après chromatographie sur colonne de célite dans les systèmes J_b et K, et chromatographie sur papier dans le système M, la dilution isotopique réalisée avec le glucuronide de testostérone de référence décrit par R. Emiliozzi (25),

$$p.f. = 295\text{-}300°, \left[\alpha\right]^{26°}_{589\ m\mu} = + 14° \pm 4°;\ c = 1\ p.cent,\ eau,$$

$$\left[\alpha\right]^{26°}_{546\ m\mu} = + 24° \pm 4°,\ c = 1\ p.cent,\ eau$$

a confirmé la pureté du produit synthétisé (Tableau II). L'activité spécifique obtenue était de 318 µcurie/mmole.

B - Glucuronide de testostérone-1,2-^{3}H.

La testostérone-1,2-^{3}H (Tracerlab, activité spécifique : 150 µcurie/µg) a été contrôlée dans les mêmes conditions que la testostérone-4-^{14}C. L'administration de ces deux composés avait été réalisée précédemment (7) et le rapport $^{3}H/^{14}C$ des 17-cétostéroides et des androstanediols s'était avéré constant, attestant la "stabilité métabolique" du tritium.

La synthèse du glucuronide de testostérone-1,2-^{3}H a été réalisée selon les mêmes étapes que précédemment, et avec les mêmes contrôles (Tableau II). L'activité spécifique du produit obtenu était de 9,8 µcurie/µmole.

T A B L E A U .II.

IDENTIFICATION DES GLUCURONIDES DE TESTOSTERONE RADIOACTIVE

1. Glucuronide de testostérone-4-^{14}C

	Activité spécifique c.p.m./mg
cristaux(o)	991
eau-mère	969

2. Glucuronide de testostérone-1,2-^{3}H

	c.p.m./mg
cristaux(o)	647
eau-mère	688

3. Glucuronide-6-^{14}C de testostérone-7α-^{3}H

	^{3}H c.p.m./mg	^{14}C c.p.m./mg
cristaux(o)	768	248
eau-mère	800	253

(o) : Cristallisation effectuée dans le méthanol - eau.

C - Glucuronide de testostérone-7α-^{3}H.

Pour réaliser les expériences métaboliques in vitro qui feront la suite du travail exposé dans cette thèse, nous désirions disposer d'un glucuronide de testostérone de très haute activité spécifique et de grande stabilité métabolique. Nous désirions également obtenir le composé intermédiaire triacétylé ester méthylique à l'état pur.

La synthèse a été réalisée à partir de testostérone-7α-^{3}H (Amersham, TRA 165, Batch 1, activité spécifique : 0,8 mcurie/μmole), contrôlée par chromatographie dans le système D modifié (isooctane - acétate d'éthyle - méthanol - eau, 8:4:9:1) et par dilution isotopique. Après abaissement de l'activité spécifique à 118 μcurie/μmole, la condensation a été réalisée comme précédemment. Le produit de condensation a alors été passé sur colonne de célite avec gradient d'élution dans le système I. Trois zones radioactives ont été détectées (Fig. 3). La plus polaire correspondait à la testostérone. La zone intermédiaire, représentant 24 p.cent de la radioactivité, correspondait au glucuronide de testostérone triacétylé ester méthylique. La pureté de ce composé a été contrôlée par chromatographie dans le système F et par dilution isotopique avec le composé pur de référence p.f. : 186-188°,

$$[\alpha]_D^{26^\circ} = +20^\circ,\ c = 1 \text{ p.cent, dioxanne}$$

(Tableau III). Après saponification, la chromatographie sur colonne de célite dans le système J_b a montré que plus de 95 p.cent de la radioactivité était contenue dans une zone de polarité correspondant au glucuronide de testostérone et dont l'identité a été contrôlée par dilution isotopique.

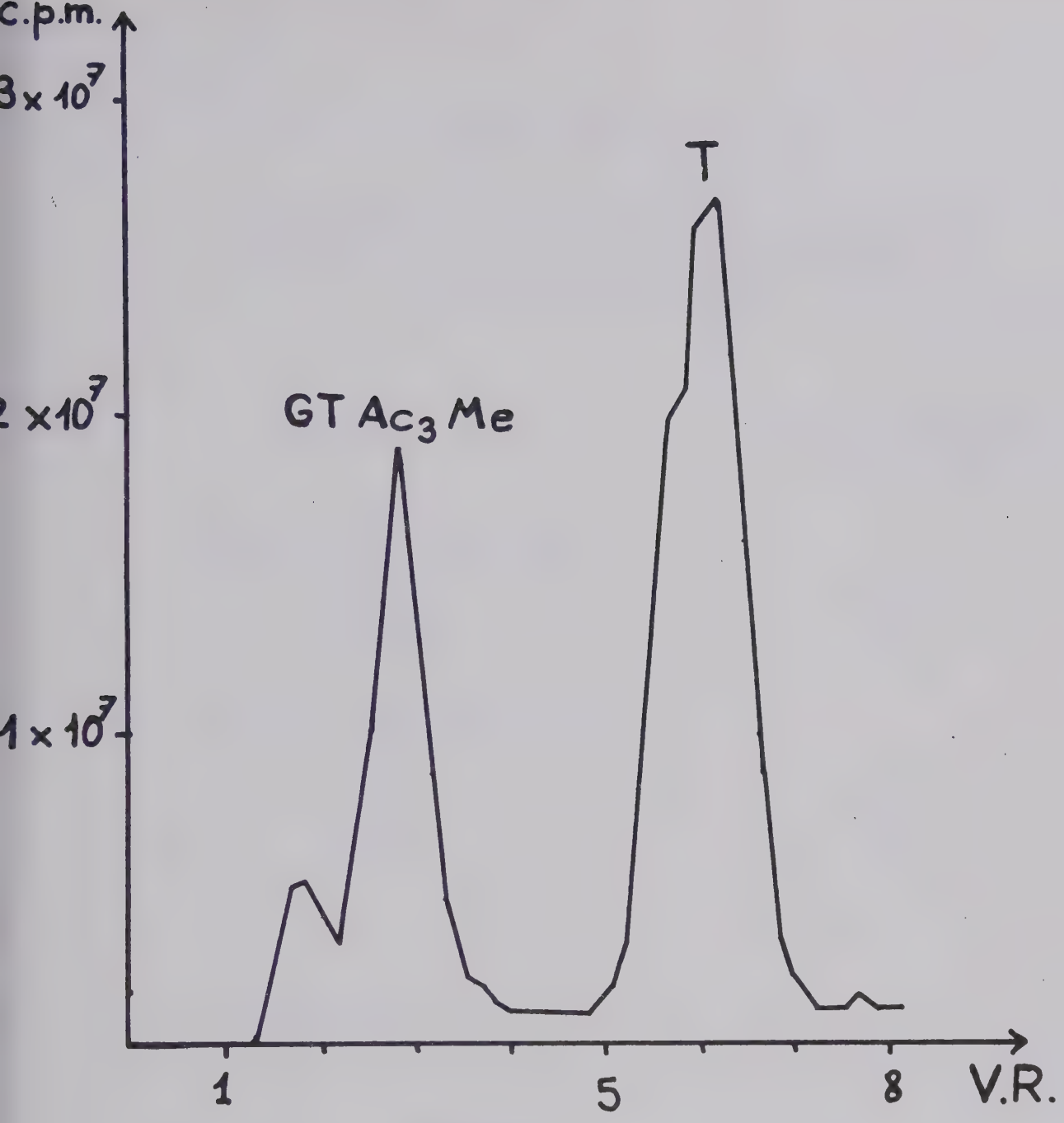


Figure 3

Purification du méthyl triacétyl glucuronide (GT Ac3Me) de testostérone-7α-^{3}H par chromatographie de partage avec gradient d'élution.

T = testostérone

T A B L E A U .III.

IDENTIFICATION DU METHYL-TRIACETYL-GLUCURONIDE

DE TESTOSTERONE-7α-^{3}H

	Activité spécifique c.p.m./mg
Première cristallisation(o)	
cristaux	3963
eau-mère	3604
Deuxième cristallisation(o)	
cristaux	3815
eau-mère	3756

(o) : Méthanol - eau

D - Glucuronide-^{14}C de testostérone-7α-^{3}H.

La même testostérone-7α-^{3}H a été utilisée pour la synthèse du glucuronide de testostérone doublement marqué.

Le D-glucuronate-6-^{14}C de potassium (New England Nuclear, plusieurs lots rassemblés d'activité spécifique finale 4 µcurie/µmole) a été traité par l'acide perchlorique 2 N, méthylé par le diazométhane dans le tétrahydrofuranne, et l'ester méthylique a été acétylé par l'anhydride acétique en milieu pyridine. Le méthyl-1,2,3,4-tétracétyl-β-D-glucopyranosyluronate-6-^{14}C a été obtenu par cristallisation dans l'éthanol avec un rendement de 16 p.cent et contrôlé par cristallisation après dilution isotopique avec le composé de référence

p.f. : 179°; $[\alpha]_D^{24°}$ = 8,7°, $HCCl_3$;

une impureté représentant près de 15 p.cent de la radioactivité a été décelée, avec les caractères chromatographiques de la forme α. Comme cette dernière donne le même dérivé bromé que la forme β, le produit n'a pas été davantage purifié.

Le méthyl-1α-bromo-1-déoxy-2,3,4-triacétyl-D-glucopyranosyl-uronate-6-^{14}C a été obtenu par l'action de l'acide bromhydrique à saturation dans l'acide acétique (28). Le dérivé bromé, instable, doit être utilisé immédiatement : 10 µmoles ont été employées et la condensation a été conduite avec un excès de testostérone-7α-^{3}H (25 µmoles) de manière à obtenir le meilleur rendement possible tout en épargnant le glucuronate-6-^{14}C particulièrement onéreux. Le produit de la condensation a été

passé sur une petite colonne de silica gel (Davison 100-200 mesh) (voir 5, A), avec élution par le mélange benzène - éther (7:3) puis purifié par chromatographie dans le système H. Après saponification par la soude méthanolique le glucuronide-^{14}C de testostérone-^{3}H a été purifié par chromatographie de partage dans les systèmes K et M. Après obtention du sel de sodium, une cristallisation a été effectuée après dilution isotopique avec du glucuronide de testostérone, sel de sodium (25) (Tableau II). Le glucuronide-^{14}C de testostérone-^{3}H a été hydrolysé par la β-glucuronidase (Kétodase) et la testostérone libérée identifiée après chromatographie dans le système D.

E - Glucuronide de déhydroépiandrostérone-7α-^{3}H.

Une demi-mcurie d'acétate de déhydroépiandrostérone-7α-^{3}H (Amersham, activité spécifique : 2 mcuries/μmole) a été saponifiée par la potasse en milieu t-butanol - eau, chromatographiée dans le système H et la pureté jugée supérieure à 90 p.cent dans les systèmes H et F et par cristallisation après dilution isotopique. La synthèse du glucuronide de déhydroépiandrostérone-7α-^{3}H a été réalisée comme précédemment à partir de 150 μcuries de déhydroépiandrostérone-7α-^{3}H dont l'activité spécifique avait été abaissée à 12,1 μcurie/μmole. La condensation a été réalisée après addition de 25 μmoles de méthyl-1α-bromo-1-déoxy-2,3,4-triacétyl-D-glucopyranosyluronate, en présence de carbonate d'argent. Le produit de condensation a été isolé par chromatographie repetée sur couche mince de silica gel H (Merck)

dans le système H. Trente sept µcuries de méthyl-triacétyl-glucuronide de déhydroépiandrostérone-^{3}H ont été obtenues et la pureté estimée à 85 p.cent par cristallisation après dilution isotopique avec le corps de référence (p.f. = 194-195°; $[\alpha]^{26°5}_{289\ m\mu}$ = 17 ± 4°, c = 1 p.cent, dioxanne) (25). La saponification a été réalisée dans la soude méthanolique et le produit obtenu contrôlé par chromatographie dans le système M et dilution isotopique avec le composé pur de référence (glucuronide de déhydroépiandrostérone, sel de sodium : p.f. 350°; $[\alpha]^{26°5}_{589\ m\mu}$ = - 26 ± 4°, c = 1 p.cent, eau) (25) et la pureté estimée à 95 p.cent.

F - Glucuronide d'épiandrostérone-7α-^{3}H.

L'épiandrostérone-7α-^{3}H obtenue par réduction de la déhydroépiandrostérone-7α-^{3}H avait une activité spécifique de 42 mcurie/µmole. Elle a été purifiée par chromatographie sur colonne de célite dans le système acétate d'éthyle - isooctane - méthanol - eau, 5:25:25:5 et par chromatographie d'adsorption dans le système A. Elle a été contrôlée par chromatographie sur papier dans le système F et par cristallisation après dilution isotopique. L'activité spécifique a été abaissée à 2,8 µcurie/µmole et la condensation a été effectuée à partir de 200 µcuries avec le méthyl-1α-bromo 1-déoxy-2,3,4-tri-O-acétyl-D-glucopyranosyluronate en présence de carbonate d'argent.

Après saponification par la soude méthanolique, le glucuronide d'épiandrostérone-7α-^{3}H a été chromatographié dans les systèmes J_a et J_b. Il a été contrôlé par chromatographie sur papier dans les systèmes M et N. Après formation du sel de sodium, la cristallisation après dilution isotopique a montré une égalité des activités spécifiques des cristaux (1.622 c.p.m./mg) et de l'eau-mère (1.604 c.p.m./mg).

L'ensemble des stéroides marqués par les radioisotopes administrés au cours de onze expériences est représenté dans le Tableau IV.

T A B L E A U . IV.

LES STEROIDES RADIOACTIFS ADMINISTRES

Expérience		Stéroide libre			Glucuronide de stéroide		
			µcurie	µg		µcurie	mg[1]
1	Homme normal	Testostérone-^{3}H	33	11			
2	Homme normal	Testostérone-^{3}H	2,4	0,02	Testostérone-^{14}C	2,5	2,2
3	Homme normal	Testostérone-^{3}H	7,6	0,05	Testostérone-^{14}C	0,2	0,2
4	Homme normal	Testostérone-^{14}C	9,2	120	Testostérone-^{3}H	3,5	0,1
5	Femme enceinte à terme normale				Testostérone-^{14}C	0,5	0,4
6	Enfant leucémique	Testostérone-^{14}C	0,7	9	Testostérone		56
7	Homme normal				Glucuronide-^{14}C de testostérone-^{3}H	0,2 1,5	0,02
8	Femme normale	Déhydroépiandrostérone-^{14}C	0,6	3	Déhydroépiandrostérone-^{3}H	7	0,17
9	Homme normal	Déhydroépiandrostérone-^{14}C	0,7	3	Déhydroépiandrostérone-^{3}H	9	0,20
10)		Epiandrostérone-^{3}H	7,0	0,05			
11)	Homme normal				Epiandrostérone-^{3}H	6,5	0,5

1 : Exprimé en poids de stéroide correspondant.

C H A P I T R E .II.

STRUCTURE DU GLUCURONIDE DE TESTOSTERONE URINAIRE

Une connaissance de la structure du glucuronide de testostérone était indispensable pour affirmer l'identité du glucuronide de testostérone radioactif injecté et du glucuronide de testostérone circulant et excrété dans les urines, et ainsi valider les résultats métaboliques obtenus.

Le glucuronide de testostérone injecté est un 17β-yl-β-glucopyranuronoside; en effet la technique de synthèse utilisée est connue pour donner exclusivement la structure β-glucopyranuronoside (39). L'absorption ultraviolette à 240 mμ de la Δ^4-3-cétone et l'hydrolyse complète par la β-glucuronidase ont été utilisées comme confirmation de la structure, puisque les β-glucofuranuronosides ne sont pas hydrolysés par l'enzyme (54), et comme confirmation de la conjugaison en C-17.

La structure du glucuronide de testostérone endogène n'est pas bien établie chez l'homme. L'hydrolyse par la β-glucuronidase des glucuronides de testostérone plasmatique (15) et urinaire (18) est le critère utilisé pour définir leur structure. Ceci ne permet pas de distinguer entre une conjugaison vraisemblable

en C-17, une conjugaison possible en C-3 de la forme énol, ou même la conjugaison simultanée au niveau du 17β-hydroxyl et du 3-énol. Edwards et Kellie (23), après administration de doses massives de testostérone à un homme normal, ont obtenu le glucuronide de testostérone urinaire à partir de la fraction cétonique d'un "extrait conjugué" acétylé et méthylé, à l'aide du réactif T de Girard.

Hadd et Rhamy (33) ont isolé le glucuronide de testostérone-^{14}C circulant après injection de 50 µcuries de testostérone-4-^{14}C à une femme porteuse d'un arrhénoblastome. Après méthylation et acétylation, le composé a été cristallisé après dilution par du 17β-yl méthyl triacétyl glucuronide de testostérone pur de référence, ce qui a permis d'affirmer l'identité des deux composés. Ces travaux n'excluaient pas formellement la présence, en plus du 17β-yl glucuronide de testostérone, des autres formes glucuroconjuguées. C'est pourquoi, nous avons cherché à mettre en évidence dans l'urine, même en quantité mineure, le diglucuronide et le 3-énol glucuronide de testostérone.

1 - Recherche de diglucuronide de testostérone urinaire.

Nous avons cherché à séparer les diglucuronides et les monoglucuronides en utilisant une extraction sélective par les solvants organiques.

Cette étude a été réalisée à l'aide de glucuronide de testostérone, de glucuronide de testostérone-1,2-^{3}H, et de

diglucuronide de 5-androstène-3β,17β-diol. Ce dernier composé a été obtenu par saponification de di[méthyl-triacétyl-glucuronide] de 5-androstène-3β,17β-diol préparé par R. Emiliozzi.

(p.f. = 271-272°, $[\alpha]_D^{23°} = -53 \pm 4°$, c = 1 p.cent, dioxanne)

Ce diglucuronide a été utilisé comme modèle car nous ne disposons pas de diglucuronide de testostérone [diglucuronide de 2,4 (ou 3,5)-androstadiène-3,17β-diol].

Après extraction par le solvant organique utilisé, les phases aqueuse et organique ont été soumises à l'hydrolyse par la β-glucuronidase (Ketodase ou suc digestif d'Helix Pomatia L) et les stéroides libérés, chromatographiés dans le système G, estimés de façon semi-quantitative directement sur le chromatogramme.

- A - Le glucuronide de testostérone est dissous dans l'eau ou l'urine, à des concentrations inférieures ou égales à 0,25 milliM, à pH 1 et après addition de 20 p.cent de ClNa (poids/volume). L'extraction est réalisée par un volume égal d'acétate d'éthyle, à l'extracteur rotatif, 3 fois une heure. Dans ces conditions, l'extraction est complète. Dans les mêmes conditions, un peu moins de 50 p.cent du diglucuronide d'androstènediol sont extraits. Lorsque le n-butanol, à pH 7 et sans addition de ClNa, est substitué à l'acétate d'éthyle, l'extraction est totale pour le glucuronide de testostérone et nulle pour le diglucuronide d'androstènediol.

- B - Ces études préliminaires étant réalisées, un homme normal a reçu par voie intraveineuse 33 µcuries de testostérone 7α-^{3}H (Amersham, TRA 165, Batch 1, activité spécifique : 2,9 mcurie/mg). Les urines des quatre jours suivant l'injection ont été extraites par le n-butanol à pH 7 (Expérience 1). Les urines résiduelles ont été hydrolysées par la β-glucuronidase et extraites par le dichlorométhane. L'extrait contenait moins de 0,1 p.cent de la radioactivité administrée. Aucun composé radioactif de la polarité de la testostérone n'a pu être décelé par chromatographie. On peut donc conclure que le diglucuronide de testostérone n'est pas excrété dans les urines de l'homme normal.

Après extraction par le butanol, hydrolyse enzymatique et extraction par le dichlorométhane, les urines résiduelles ont été soumises à l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique à 10 p.cent, à 100° pendant 15 minutes. Après extraction par le dichlorométhane et chromatographie dans les systèmes E et F, de la testostérone radioactive représentant moins de 1 p.cent du 17β-yl glucuronide de testostérone urinaire a été détectée (mais non identifiée avec rigueur). Cette testostérone libérable par hydrolyse acide ne peut de toute façon pas intervenir dans la mesure des activités spécifiques de la testostérone libérée par la β-glucuronidase.

2 - Recherche de 3-énol glucuronide de testostérone urinaire.

- A - L'extrait butanolique de l'expérience 1 a été chromatographié dans le système I. Les glucuronides et les conjugués polaires élués par l'acétone - méthanol (50:50) et (25:75) et le méthanol ont été chromatographiés à nouveau dans les systèmes J, K et L. La position du glucuronide de testostérone-^{3}H dans l'éluat de ces colonnes a été indiquée par l'addition d'un traceur de glucuronide de testostérone-^{14}C. Après hydrolyse enzymatique, la testostérone a été identifiée comme le seul stéroide-^{3}H et -^{14}C de cette fraction par chromatographie dans le système E et cristallisation après dilution isotopique. La testostérone isolée représentait 0,7 p.cent de la radioactivité injectée.

Une étude préliminaire avait montré que le 17β-yl glucuronide de testostérone peut être séparé du 3-énol glucuronide. Nous ne disposions pas de 3-énol glucuronide de testostérone, dont nous n'avons pu réussir la synthèse. Aussi avons-nous utilisé comme composé de polarité très voisine, étant donné la grande similitude chimique, le glucuronide de 5-androstène-3β,17β-diol. Celui-ci a été obtenu en hydrogénant par le borohydrure de potassium le glucuronide de déhydroépiandrostérone précédemment décrit. Nous avons observé que le glucuronide de testostérone et le glucuronide d'androstènediol sont complètement séparés par chromatographie de partage avec

élution graduelle dans le système K. Nous avons supposé qu'il en est de même du 3-énol glucuronide de testostérone. Dans ces conditions tous les éluats de la chromatographie des glucuronides de l'expérience 1 ont été réunis à l'exception du 17β-yl glucuronide de testostérone-^{3}H-^{14}C. Ils ont été hydrolysés par la β-glucuronidase, les stéroides libres extraits par le dichlorométhane, et après chromatographie la testostérone isolée représentait moins de 0,01 p.cent de la radioactivité injectée. Ceci représente au maximum 1,5 p.cent de la testostérone urinaire, et semble constituer la valeur maxima de la formation de 3-énol glucuronide.

- B - Une deuxième étude a été réalisée sur les métabolites urinaires de l'expérience 4. Les urines avaient été extraites par l'acétate d'éthyle selon la méthode décrite. Une part des lavages alcalins de la solvolyse, contenant les glucuronides de stéroides, a été extraite par le n-butanol à pH 7, de façon à séparer les monoglucuronides des conjugués polaires. Le reste de l'extrait a été hydrolysé par la β-glucuronidase.

Le glucuronide de testostérone radioactif a été isolé par chromatographie dans les systèmes K et L. Puisque, dans cette expérience, le glucuronide de testostérone-1,2-^{3}H et la testostérone-4-^{14}C ont été injectés, le glucuronide de testostérone-^{3}H-^{14}C isolé en tant que 17β-yl glucuronide de l'extrait butanolique devrait avoir le même rapport $^{3}H/^{14}C$ que la testostérone-^{3}H-^{14}C libérée par la β-glucuronidase;

ceci dans le cas où le 17β-yl glucuronide de testostérone était le seul glucuronide de testostérone formé à partir de la testostérone-^{14}C et hydrolysé par la β-glucuronidase. Par contre, si un autre glucuronide de testostérone-^{14}C était présent en quantité significative, il y aurait plus de ^{14}C dans la testostérone libérée par la β-glucuronidase que dans la testostérone isolée en tant que 17β-yl glucuronide.

Les résultats ont montré une égalité des rapports $^{3}H/^{14}C$ dans les deux cas (3,01 et 3,09).

Le 17β-yl glucuronide de testostérone est donc le seul glucuronide de testostérone excrété dans l'urine en quantité significative.

L'emploi comme traceurs de 17β-yl glucuronides de testostérone radioactifs est donc justifié et les expériences réalisées peuvent être considérées comme physiologiques, dans la mesure du moins où la masse de corps marqué injectée ne modifie pas l'état d'équilibre de l'organisme.

CHAPITRE .III.

METABOLISME DU GLUCURONIDE DE TESTOSTERONE

Les stéroides radioactifs administrés figurent dans le Tableau IV.

I - Les métabolites urinaires chez trois hommes normaux (Expériences 2, 3 et 4).

Les principaux résultats sont rapportés dans les Tableaux V, VI et VII. Le schéma du protocole analytique est donné dans la figure 4.

1 - Les 5β-métabolites radioactifs urinaires.

Ils étaient marqués à la fois par le carbone-14 et le tritium.

- A - La 5β-androstérone dans la fraction glucuronide

La fraction contenant les "glucuronides cétoniques" a été chromatographiée dans le système E. Les tubes du pic de 5β-androstérone ont été rassemblés, et après évaporation des solvants, le résidu a été chromatographié dans le système A.

T A B L E A U .V.

INJECTION INTRAVEINEUSE DE TESTOSTERONE-^{3}H ET DE GLUCURONIDE DE TESTOSTERONE-^{14}C

A UN HOMME NORMAL

(Expérience 2)

	conversion[1] de la testostérone-^{3}H	conversion du glucuronide de testostérone-^{14}C	$^{14}C/^{3}H$	R[3]
Métabolites urinaires[2]				
androstérone (sulfate)	4,2	0,1	0.01	0.01
épiandrostérone (sulfate)	1,2	0,1	0.01	0.01
androstérone (glucuronide)	4,1	0,1	0.01	0.01
androstanediol (glucuronide)	1,2	0,1	0.05	0.1
5β-androstérone (sulfate)	0,7	0,4	0.8	0.6
5β-androstérone (glucuronide)	5,2	6,0	1.7	1.2
5β-androstanediol (glucuronide)	2,7	8,7	4.5	3.3
testostérone (glucuronide)	-[4]	16,2	-	-

1 : Pourcentage de conversion du composé injecté en le métabolite urinaire
2 : Métabolites isolés après hydrolyse sélective des sulfates et glucuronides (Chap. I, 1)
3 : Pour la définition du R voir Chap. I, 4
4 : Non mesurable

T A B L E A U .VI.

INJECTION INTRAVEINEUSE DE TESTOSTERONE-^{3}H ET DE GLUCURONIDE DE TESTOSTERONE-^{14}C

A UN HOMME NORMAL

(Expérience 3)

	conversion[1] de la testostérone-^{3}H	conversion du glucuronide de testostérone-^{14}C	$^{14}C/^{3}H$	R[3]
Métabolites urinaires[2]				
androstérone (sulfate)	3,6	-[4]	-	< 0,01
épiandrostérone (sulfate)	1,4	-	-	< 0,01
androstérone (glucuronide)	7,1	-	-	< 0,01
androstanediol (glucuronide)	0,9	-	-	< 0,01
5β-androstérone (sulfate)	0,7	-	-	-
5β-androstérone (glucuronide)	5,3	3,8	0,05	0,7
5β-androstanediol (glucuronide)	1,8	4,3	0,16	2,3
testostérone (glucuronide)	0,6	11,0	1,28	18,3

taux de production (mg/24 H.) : testostérone = 8,6 - glucuronide de testostérone = 0,38

1 : Pourcentage de conversion du composé injecté en le métabolite urinaire
2 : Métabolites isolés après hydrolyse sélective des sulfates et glucuronides (Chap. I, 1)
3 : Pour la définition du R voir Chap. I, 4
4 : Non mesurable

T A B L E A U .VII.

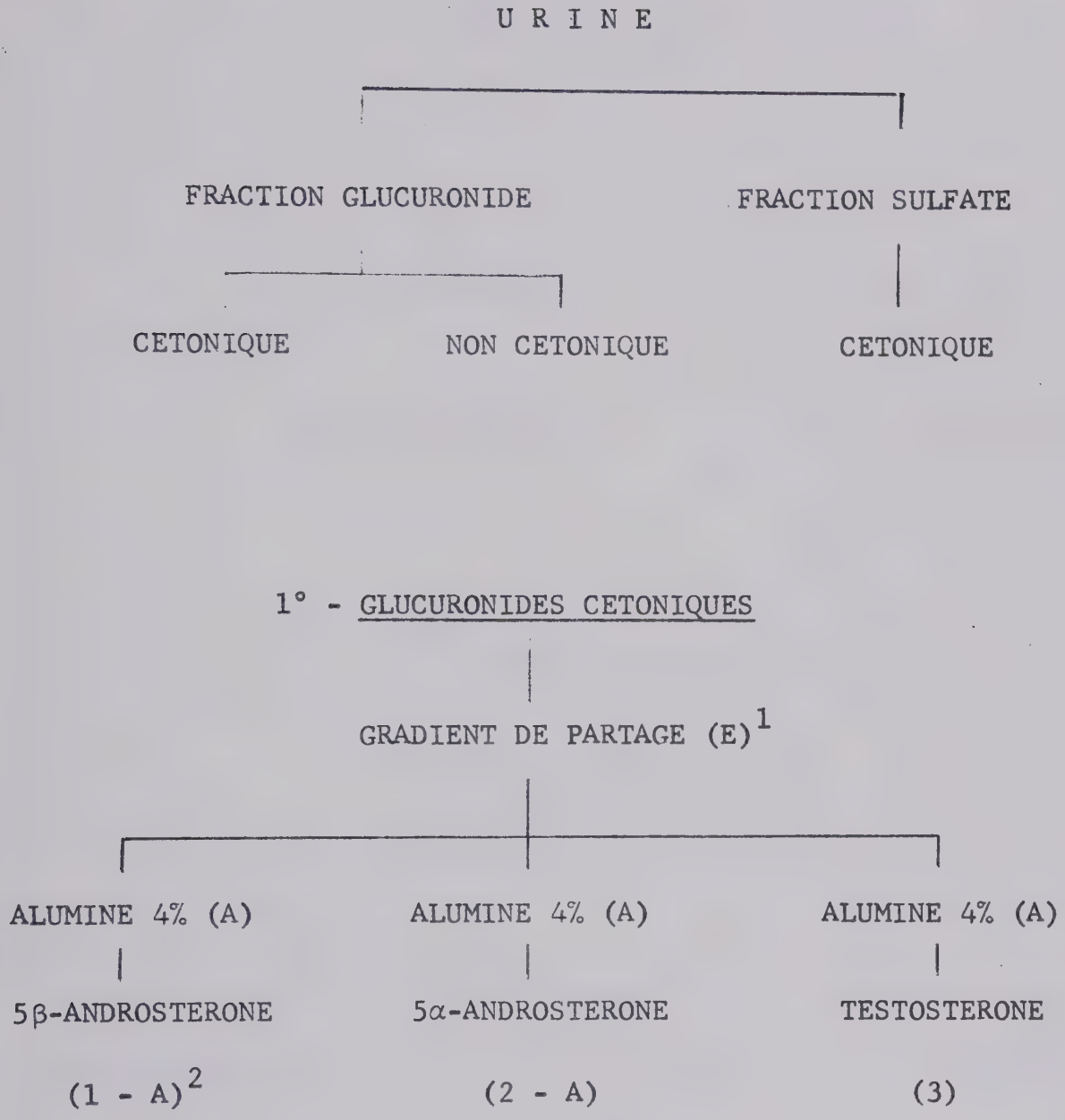
INJECTION INTRAVEINEUSE DE TESTOSTERONE-^{14}C ET DE GLUCURONIDE DE TESTOSTERONE-^{3}H A UN HOMME NORMAL

(Experience 4)

	conversion[1] de la testostérone-^{14}C	conversion du glucuronide de testostérone-^{3}H	$^{3}H/^{14}C$	R^3
étabolites urinaires[2]				
ndrostérone (sulfate)	7,6	-[4]	-	-
piandrostérone (sulfate)	2,6	-	-	-
ndrostérone (glucuronide)	14,1	-	-	-
ndrostanediol (glucuronide)	1,8	-	-	-
β-androstérone (sulfate)	2,7	1,2	0,1	0.4
β-androstérone (glucuronide)	9,3	9,6	0.2	1.0
β-androstanediol (glucuronide)	2,9	16,3	1,1	5,6
estostérone (glucuronide)	1,5	23,5	2,9	15,6

taux de production (mg/24 H.) : testostérone = 6,9 - glucuronide de testostérone = 0,40

1 : Pourcentage de conversion du composé injecté en le métabolite urinaire
2 : Métabolites isolés après hydrolyse sélective des sulfates et glucuronides (Chap. I, 1)
3 : Pour la définition du R voir Chap. I, 4
4 : Non mesurable



1 : les lettres désignent le système de chromatographie.
2 : Numéro des paragraphes de la section "Résultats".

Figure 4.

Schéma du protocole analytique (Expériences 2, 3, 4).

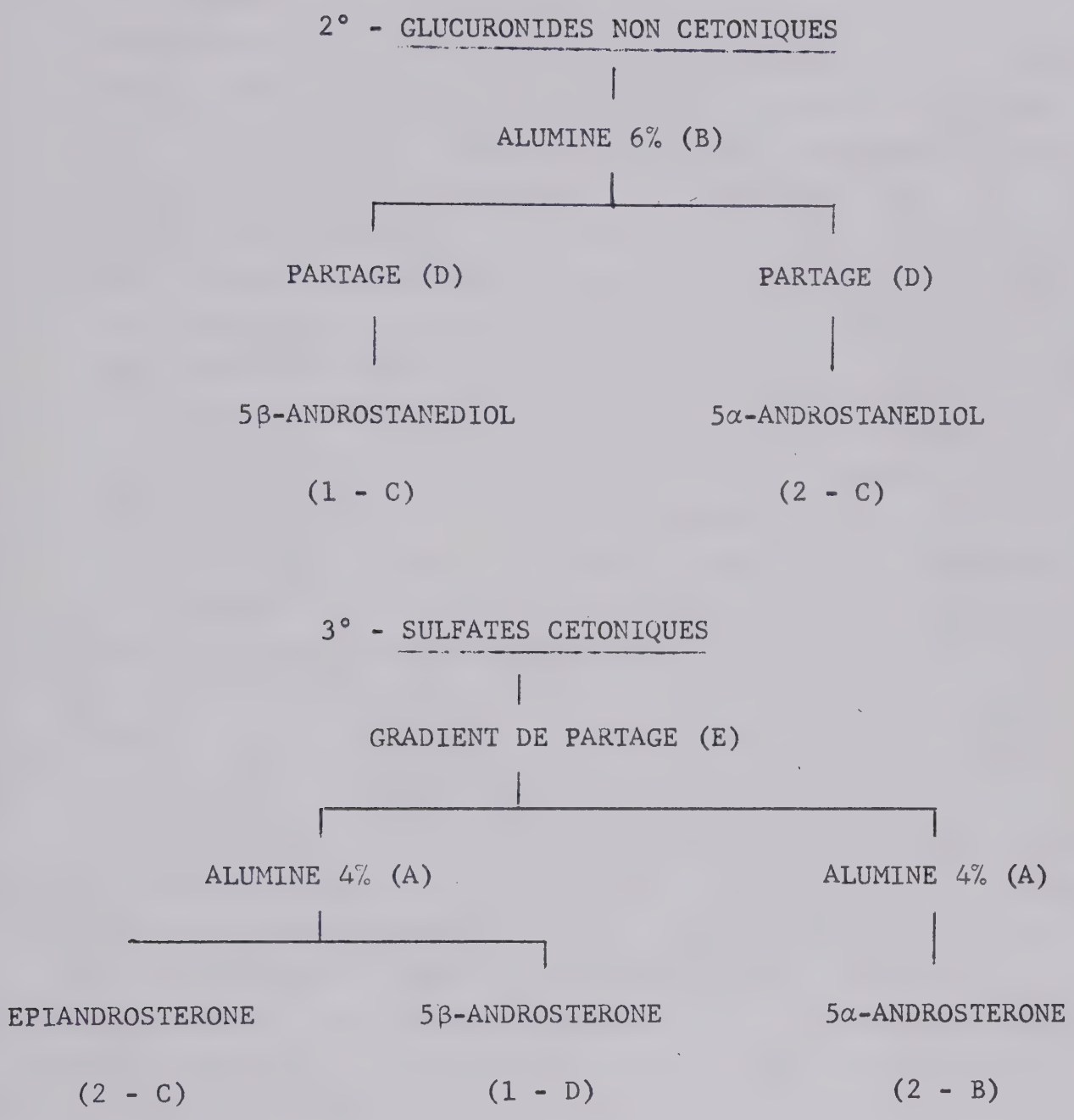


Figure .4. (fin)

Schéma du protocole analytique (Expériences 2, 3, 4).

Après réunion et évaporation des tubes du pic, un aliquote a été prélevé et de la 5β-androstérone pure de référence (Roussel-UCLAF) a été ajoutée. La cristallisation a été réalisée dans le méthanol - eau, l'égalité d'activité spécifique des cristaux et de l'eau-mère a confirmé l'homogénéité radiochimique de la 5β-androstérone-^{14}C-^{3}H (Tableau VIII). Des preuves supplémentaires ont été apportées par la chromatographie en couche mince dans le système C et la chromatographie sur papier dans le système F. Ces différentes étapes chromatographiques ont été réalisées afin de séparer en toute certitude la 5β-androstérone-^{14}C-^{3}H des autres stéroides, métabolites possibles du glucuronide de testostérone, et possédant un hydroxyl équatorial en C-3 (épiandrostérone), et de la 17β-hydroxy-5β-androstane-3-one, dont la polarité est très proche de celle de la 5β-androstérone. On n'a observé ni épiandrostérone ni 17β-hydroxy-5β-androstane-3-one radioactifs. De plus on a recherché la présence de 3α- ou 3β-hydroxy-4-androstène-17-one, car ces composés sont aussi, en théorie, des métabolites possibles de la testostérone et du glucuronide de testostérone, et de polarité très voisine de la 5β-androstérone. Le résidu des eaux-mères de la cristallisation décrite Tableau VIII a été additionné de 0,1 mg de 4-androstène-3β,17β-diol, le mélange dissous dans 5 ml de chloroforme, puis 10 mg de MnO_2 ont été ajoutés, et l'oxydation a été prolongée une nuit à la température du laboratoire, avec agitation continue (58). Après filtration et évaporation du solvant, le résidu a été

T A B L E A U .VIII.

IDENTIFICATION DE LA 5β-ANDROSTERONE RADIOACTIVE DANS L'EXPERIENCE 2.

(I - 1 - A)

		Activités spécifiques (c.p.m./mg)		
		Théorique	Cristaux	Eau-mère
5β-androstérone (glucuronide)[1]	^{14}C	2.000	2.060	1.960
	^{3}H	1.120	1.170	1.040
	$^{14}C/^{3}H$	1,8	1,8	1,9
5β-androstérone (sulfate)[1]	^{14}C	545	500	500
	^{3}H	720	660	690
	$^{14}C/^{3}H$	0,8	0,8	0,8

1 : Métabolites isolés après hydrolyse sélective du glucuronide et du sulfate (Chap. I, 1)

mis en solution dans le méthanol et le rendement de l'oxydation a été obtenu par la mesure de l'absorption à 240 mμ de la testostérone formée à partir du 4-androstène-3β,17β-diol. Puisque, de façon analogue, la 3α- ou 3β-hydroxy-4-androstène-17-one radioactive aurait donné de la 4-androstène-3,17-dione, l'extrait a été chromatographié dans le système F et les 4 régions du 4-androstène-3β,17β-diol, de la 5β-androstérone, de la testostérone et de la 4-androstènedione ont été analysées par comptage en scintillation liquide. Dans la zone de la 4-androstènedione, du tritium, à la limite du bruit de fond, a été détecté mais l'absence de carbone-14 montrait l'absence de 3α- ou 3β-hydroxy-4-androstène-17-one-^{14}C dans la fraction identifiée comme la 5β-androstérone-^{14}C. Le rapport $^{3}H/^{14}C$ de la 5β-androstérone n'a pas été modifié après l'oxydation par le MnO_2.

L'acétate de la 5β-androstérone-^{14}C-^{3}H a été formé, par action de l'anhydride acétique dans la pyridine; il migrait sur papier dans le système F comme l'acétate de 5β-androstérone de référence.

L'hydrogénation par le borohydrure de potassium d'un autre aliquote de la 5β-androstérone-^{14}C-^{3}H a donné un composé doublement marqué avec la même migration que le 5β-androstane-diol dans le système G. Le rapport $^{14}C/^{3}H$ est demeuré constant après la formation de ces différents dérivés de la 5β-androstérone-^{14}C-^{3}H.

- B - La 5β-androstérone dans la fraction sulfate.

Les "sulfates cétoniques" ont été chromatographiés dans le système F. Les tubes contenant la 5β-androstérone et l'épiandrostérone ont été rassemblés et chromatographiés dans le système A. Une part de la 5β-androstérone-^{14}C-^{3}H isolée a été additionnée de 5β-androstérone de référence et la cristallisation dans le benzène - isooctane (Tableau VIII) a donné la preuve de son homogénéité radiochimique. L'oxydation par le MnO_2 d'une partie des cristaux de la dernière cristallisation a donné les mêmes résultats que pour le glucuronide de 5β-androstérone correspondant (I - 1 - A). L'acétate avait la même polarité en chromatographie sur papier que l'acétate de 5β-androstérone de référence, et le rapport $^{3}H/^{14}C$ de ces dérivés était le même que celui du composé d'origine.

- C - Le 5β-androstane-3α,17β-diol dans la fraction glucuronide

La fraction "glucuronide non cétonique" a été chromatographiée dans le système B. Les tubes du seul pic radioactif ont été rassemblés; un aliquote avait la polarité du 5β-androstanediol de référence dans le système G. Le reste du pic a été rechromatographié dans le système acétate d'éthyle - isooctane - méthanol - eau, 5:8:9:1 et pratiquement toute la radioactivité a été retrouvée dans un seul pic. Du 5β-androstanediol de référence a été ajouté à une partie du contenu de

ce pic et des cristallisations successives ont été réalisées, démontrant l'homogénéité radiochimique du produit (Tableau IX).

Une autre part du contenu du pic radioactif a été soumise à l'oxydation par le MnO_2 après addition de 0,1 mg de 4-androstène-3β,17β-diol. La formation de testostérone a été détectée par mesure de l'absorption ultraviolette (Cf : I - 1 - A), mais après chromatographie sur papier dans le système G, on n'a pas décelé de radioactivité dans cette zone, ce qui démontre l'absence de 4-androstène-3α- ou 3β-17β-diol radioactif mélangé au 5β-androstanediol-^{14}C-^{3}H. L'oxydation par le MnO_2 n'a pas modifié le rapport $^{14}C/^{3}H$ du 5β-androstanediol, compte tenu de l'atténuation occasionnée par l'élution du papier. Une dernière portion du 5β-androstanediol-^{14}C-^{3}H a été acétylée et chromatographiée sur papier dans les systèmes G et heptane - phénylcellosolve. Le produit radioactif avait la polarité du diacétate de 5β-androstanediol de référence.

2 - Les 5α-métabolites radioactifs urinaires.

Ils ne contenaient que l'isotope correspondant à la testostérone injectée.

- A - La 5α-androstérone dans la fraction glucuronide.

Le premier pic radioactif de la chromatographie des "glucuronides cétoniques" dans le système E correspondait à l'androstérone. Les tubes du pic ont été rassemblés et après

T A B L E A U .IX.

IDENTIFICATION DU 5β-ANDROSTANEDIOL (GLUCURONIDE) RADIOACTIF DANS L'EXPERIENCE 2.

(I - 1 - C)

	Activités spécifiques (c.p.m./mg)		
	^{14}C	^{3}H	$^{14}C/^{3}H$
Théorique	1,100	-[3]	-
Première cristallisation[1]			
cristaux	990	-	-
eau-mère	930	-	-
Deuxième cristallisation[2]			
cristaux	1,090	-	-
eau-mère	1,020	-	-
Troisième cristallisation[3]			
cristaux	980	220	4,6
eau-mère	1,010	230	4,3

1 : Méthanol - eau
2 : Benzène - isooctane
3 : En raison de la faible solubilité du 5β-androstanediol dans le toluène scintillant, 2 ml de méthanol ont été ajoutés pour le comptage des deux premières cristallisations, et 0,2 dans la troisième. La correction a été faite pour le quenching. Seul le calcul de la 3ème cristallisation où le quenching était faible, a paru donner une précision suffisante.

évaporation des solvants, une chromatographie a été effectuée dans le système A. Le seul pic radioactif avait la polarité de la 5α-androstérone. Après addition d'androstérone, la cristallisation dans le méthanol - eau a confirmé l'identité de l'androstérone et le très faible rapport $^{14}C/^{3}H$ dans les expériences 2 et 3, et $^{3}H/^{14}C$ dans l'expérience 4.

- B - La 5α-androstérone dans la fraction sulfate.

Le pic d'androstérone de la chromatographie des "sulfates cétoniques" dans le système E a été purifié par passage dans le système A. Son identité a été contrôlée par chromatographie sur papier dans le système F, ce qui a permis de vérifier l'absence de 17β-hydroxy-5α-androstane-3-one. Une autre part du pic radioactif observé dans le système A a été additionnée de 5α-androstérone de référence et cristallisée dans le benzène - isooctane. Les activités spécifiques identiques des cristaux et des eaux-mères ont confirmé l'homogénéité du composé isolé.

- C - L'épiandrostérone dans la fraction sulfate.

Le second pic radioactif de la chromatographie dans le système E des "sulfates cétoniques" a été purifié dans le système A. Il avait la polarité de l'épiandrostérone dans le système F. On n'a pas obtenu de preuve rigoureuse de son identité.

- D - Le 5α-androstane-3α,17β-diol dans la fraction glucuronide.

Le premier pic radioactif de la chromatographie des "glucuronides non cétoniques" dans le système B correspondait au 5α-androstanediol. Un aliquote, chromatographié dans le système G, avait la polarité du 5α-androstanediol de référence. Le reste de cette fraction a été purifié par passage sur colonne de célite dans le système acétate d'éthyle - isooctane - méthanol - eau, 4:8:9:1. Après addition de 5α-androstanediol de référence, la cristallisation dans le méthanol - benzène a démontré l'identité des activités spécifiques des cristaux et des eaux-mères.

3 - La testostérone dans la fraction glucuronide.

L'éluat de la chromatographie des "glucuronides cétoniques" correspondant à la testostérone a été purifié dans le système A. L'activité spécifique des tubes du seul pic radioactif a été mesurée à l'aide de l'absorption à 240 mμ. Les valeurs obtenues dans l'expérience 3 par exemple sont successivement (c.p.m./μg) : ^{3}H : 111, 126, 117, 116; ^{14}C : 148, 157, 156, 146. La cristallisation dans le benzène - isooctane, après addition du composé analytique de référence, a confirmé la pureté radiochimique du composé isolé (Tableau X).

T A B L E A U .X.

IDENTIFICATION DE LA TESTOSTERONE (GLUCURONIDE) RADIOACTIVE DANS LES EXPERIENCES 2 ET 3.

(I - 3)

	Activités spécifiques (c.p.m./mg)		
	^{14}C	^{3}H	$^{14}C/^{3}H$
Expérience 2			
Théorique	240	-[2]	-
cristaux[1]	215	-	-
eau-mère	225	-	-
Expérience 3			
Théorique	275	285	1,0
cristaux[1]	285	295	1,0
eau-mère	255	270	0,9

1 : Méthanol - eau

2 : Dans l'expérience 2, le tritium n'était pas détectable dans le glucuronide de testostérone urinaire, c'est pourquoi le rapport $^{3}H/^{14}C$ des traceurs injectés a été modifié dans l'expérience 3.

II - Les métabolites urinaires chez une femme enceinte à terme (expérience 5).

Chez cette femme le glucuronide de testostérone-^{14}C avait été administré dans le cadre d'une étude systématique des précurseurs possibles des oestrogènes placentaires. Cette étude avait montré le rôle privilégié du sulfate de déhydro-épiandrostérone (4). Par contre le glucuronide de testostérone-^{14}C, contrairement à la testostérone, n'a donné lieu à la formation d'aucun oestrogène. Le Tableau XI montre que le taux d'excrétion des principaux métabolites neutres urinaires est comparable à ce qui s'observe chez l'homme normal.

Nous avons poursuivi avec L. Cédard, à l'aide d'expériences in vitro l'étude du métabolisme placentaire du glucuronide de testostérone. Le glucuronide de testostérone-1,2-^{3}H et la testostérone-4-^{14}C ont été soit injectés dans le liquide de perfusion placentaire (20), soit incubés en présence de microsomes de placenta à terme. On n'a observé ni oestrogènes-^{3}H libres ou conjugués, ni stéroides-^{3}H neutres libres, par contre plusieurs métabolites-^{3}H glucuroconjugués ont été détectés mais non identifiés.

Le glucuronide de testostérone-1,2-^{3}H perfusé dans le placenta n'a donc pas été hydrolysé. D'autre part, le rapport $^{3}H/^{14}C$ de l'effluent placentaire était très supérieur à celui du liquide de perfusion, ce qui suggère que le glucuronide de testostérone n'a pas, comme la testostérone, pénétré ou été retenu dans les cellules du placenta (Tableau XII).

TABLEAU XI.

INJECTION INTRAVEINEUSE DE GLUCURONIDE DE TESTOSTERONE-^{14}C A UNE FEMME ENCEINTE (Expérience 5) ET INJECTION INTRAMUSCULAIRE DE TESTOSTERONE-^{14}C ET DE GLUCURONIDE DE TESTOSTERONE A UN ENFANT (Expérience 6)

EXPERIENCE 5

Composé injecté :	Glucuronide de testostérone-^{14}C
Métabolites urinaires	Pourcentage de conversion[1]
Androstérone	$< 0,1$
5β-androstérone	3,8
5β-androstanediol	8,2
Testostérone	2,9

EXPERIENCE 6

Composés injectés :	Testostérone-^{14}C	Glucuronide de testostérone
Métabolites urinaires (glucuronides)	Pourcentage de conversion	Pourcentage de conversion
Androstérone	5,9	$\leq 0,3$
5β-androstérone	3,0	2,8
Testostérone	1,0	20,0

1 : Pourcentage de conversion $= \frac{\text{c.p.m. dans les métabolites}}{\text{c.p.m. injectés}} \times 100$

T A B L E A U .XII.

PERFUSION DE PLACENTA HUMAIN A TERME PAR LE GLUCURONIDE DE TESTOSTERONE-^{3}H ET LA TESTOSTERONE-^{14}C.

	Conversion[1] de la testostérone-^{14}C	Conversion du glucuronide de testostérone-1,2-^{3}H
Métabolites du liquide de perfusion placentaire :		
Libres		
Neutres	5,4	1
Phénoliques	17,5	-[3]
Glucuroconjugués[2]		
Neutres	24,4	72,4
Phénoliques	-	1,9[4]

1 : Pourcentage de conversion du composé injecté en le métabolite urinaire.
2 : Métabolites isolés après hydrolyse sélective des glucuronides (Chap. I, 1).
3 : Non mesurable.
4 : On n'a pas vérifié s'il s'agit réellement d'oestrogènes.

III - Les métabolites urinaires chez un enfant (Expérience 6)

Les principaux métabolites urinaires identifiés chez un enfant après injection intramusculaire de testostérone-^{14}C et glucuronide de testostérone en solution dans le propylène glycol figurent dans le Tableau XI.

1 - Le glucuronide de testostérone urinaire.

La chromatographie sur papier dans le système F d'un aliquote des "glucuronides cétoniques" a montré une zone absorbant l'ultraviolet à 240 mμ de la polarité de la testostérone. Le reste de l'extrait a été chromatographié dans le système A puis sur colonne de célite dans le système acétate d'éthyle - isooctane - méthanol - eau, 8:22:25:5. Les courbes d'absorption ultraviolette à 240 mμ et de radioactivité-^{14}C coincidaient parfaitement. En dépit (ou en raison) de la dose de charge utilisée, le pourcentage d'excrétion du glucuronide de testostérone dans l'urine est du même ordre de grandeur que celui obtenu chez les adultes. La testostérone-^{14}C est elle aussi convertie en glucuronide de testostérone urinaire dans le même pourcentage que chez les adultes.

2 - Le glucuronide de 5β-androstérone urinaire.

La 5β-androstérone a été isolée par chromatographie dans le système A de la fraction "glucuronide cétonique", les tubes du pic correspondant à la 5β-androstérone-^{14}C ont été réunis

et après évaporation le résidu a été chromatographié dans le système F. La zone de la 5β-androstérone a été éluée du papier par le méthanol et l'éluat purifié par passage sur colonne de silice - célite (système P). Le résidu a été analysé par spectrophotométrie infrarouge qui a confirmé l'identité de la 5β-androstérone.

La conversion de la testostérone-^{14}C en glucuronides de 5α- et 5β-androstérone-^{14}C urinaires montre la prépondérance de la forme 5α habituelle chez l'enfant. Ceci explique sans doute que le taux de conversion du glucuronide de testostérone en 5β-androstérone urinaire est chez l'enfant inférieur à la conversion correspondante chez les adultes.

Les métabolites non cétoniques n'ont pas été étudiés.

DISCUSSION

Le glucuronide de testostérone est soumis à un métabolisme ultérieur *in vivo*. De plus ce métabolisme, contrairement à celui de la testostérone, est orienté vers la formation exclusive de 5β-métabolites (Fig. 5). La production de glucuronide de testostérone, et partant la formation de glucuronide de testostérone à partir de la testostérone, est un phénomène relativement mineur. Ces résultats reposent sur des considérations qualitatives et quantitatives qui seront maintenant discutées.

I - Considérations qualitatives.

Si des stéroides conjugués, considérés classiquement comme des déchets métaboliques, ne sont pas complètement excrétés et donnent un ou plusieurs métabolites, ceci peut être dénommé un "métabolisme ultérieur" (8). Certains sulfates de stéroides peuvent être métabolisés "directement", sans clivage de l'ester : la transformation de sulfates-^{35}S de stéroides-^{3}H en d'autres sulfates-^{35}S de stéroides-^{3}H en a fourni la démonstration (2, 17); le métabolisme peut être aussi "indirect", après clivage de l'ester-sulfate (3, 49, 59). Le glucuronide

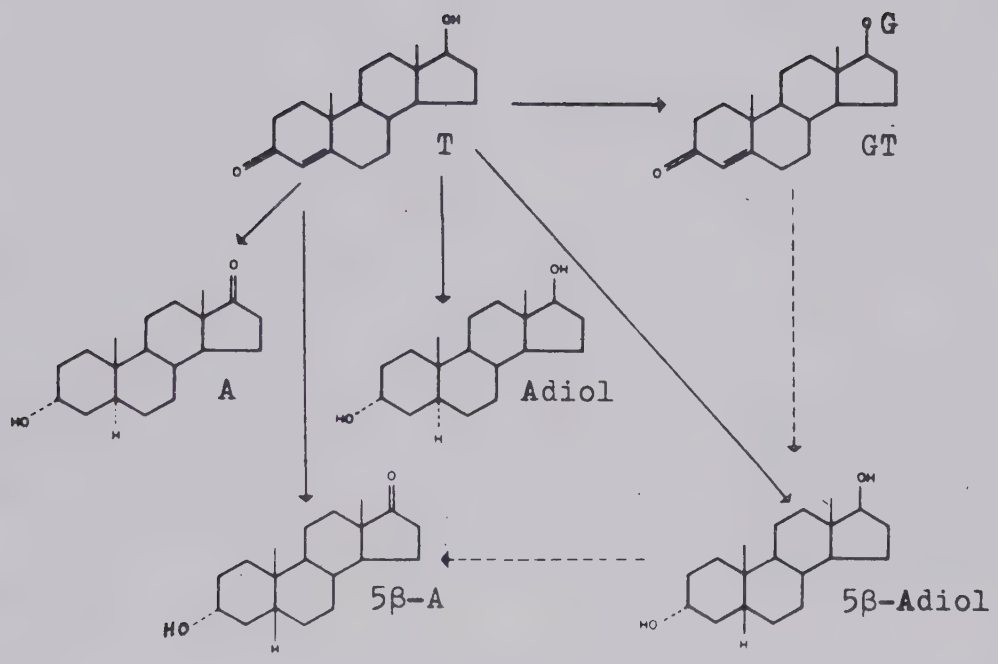


Figure .5.

5β-métabolisme sélectif du glucuronide de testostérone.
T : testostérone; G : glucuronide; A : androstérone;
5β-A : 5β-androstérone; Adiol : androstane-3α,17β-diol;
5β-Adiol : 5β-androstane-3α,17β-diol.

de testostérone donne des métabolites urinaires. Il est donc contrairement aux glucuronides d'androstérone (56) et d'aldostérone (60) soumis à un "métabolisme ultérieur". S'agit-il d'un métabolisme "indirect" ou "direct" ?

1 - S'il s'agissait d'un métabolisme "indirect", il faudrait expliquer l'absence de formation de 5α-métabolites à partir de la testostérone libérée par le clivage de la liaison osidique. Certes on peut imaginer que la libération de testostérone se fasse dans un compartiment métabolique, d'où elle ne peut sortir dans la circulation sanguine, et où elle donne uniquement des 5β-métabolites. Cette explication est peu vraisemblable eu égard à la distribution très générale des Δ4-3 cétostéroide-5α-déshydrogénases dans l'organisme, chez l'animal et chez l'homme. Cependant, à une étape ultérieure du métabolisme, la rupture de la liaison osidique doit survenir, puisque la formation de la 5β-androstérone, porteuse d'une cétone en C-17, ne peut se faire qu'après hydrolyse du 17β-yl glucuronide.

2 - C'est pourquoi nous avons été amenés à postuler un "métabolisme initialement direct" du glucuronide de testostérone. Celui-ci serait transformé en d'autres glucuronides de stéroides, ultérieurement hydrolysés pour donner de la 5β-androstérone. Le pourcentage de conversion du glucuronide de testostérone radioactif en 5β-androstane-3α,17β-diol urinaire

marqué est supérieur à la conversion en 5β-androstérone urinaire marquée, alors que chez les mêmes sujets la conversion de la testostérone radioactive en 5β-androstane-3α,17β-diol est inférieure à la moitié de la conversion en 5β-androstérone. De plus, la conversion du 5β-androstanediol en 5β-androstérone in vivo chez l'homme était considérée comme très probable (7). Nous avons administré par voie intraveineuse à un homme normal du 5β-androstanediol-7α-^{3}H, que nous avions obtenu par réduction de 5β-androstérone-7α-^{3}H d'origine biologique préparée au laboratoire. La plus grande partie des métabolites-^{3}H urinaires était représentée par la 5β-androstérone. Il est donc concevable que le 5β-androstane-3α,17β-diol provienne de la réduction de la double liaison du glucuronide de testostérone et soit le précurseur de la 5β-androstérone.

3 - La conjugaison du 5β-androstane-3α,17β-diol n'est pas bien connue chez l'homme; il semble qu'il s'agisse d'un glucuronide, mais on ne sait pas si la conjugaison se fait en C-3, en C-17 ou si les deux éventualités sont possibles. Même un glucuronide-sulfate ne peut être formellement exclu, et à cet égard on peut souligner que le R du sulfate de 5β-androstérone est régulièrement la moitié de celui du glucuronide de 5β-androstérone, ce qui se concevrait mal si la 5β-androstérone elle-même était le précurseur du sulfate et du glucuronide de 5β-androstérone urinaires. Quelle que soit l'explication ceci montre que deux précurseurs peuvent contribuer différemment aux deux formes conjuguées d'un même métabolite.

4 - D'autres voies métaboliques entre le glucuronide de testostérone et la 5β-androstérone sont certes concevables. Les résultats présentés suggèraient que tout intermédiaire ne peut être transformé en 5α-métabolites, et ne peut être aromatisé dans le placenta (Expérience 5). L'hypothèse la plus probable restait que le glucuronide de testostérone est initialement transformé en 17β-yl glucuronide de 5β-androstane-diol et que la 5β-androstérone dérivait de ce dernier. La démonstration de cette étape métabolique fera l'objet du Chapitre IV.

5 - D'autres travaux seront nécessaires pour déterminer si le 5β-métabolisme de la testostérone est déterminé par la spécificité des 3-cétostéroide-Δ4-deshydrogénases, seules les 5β-Δ4-deshydrogénases acceptant le glucuronide de testostérone pour substrat, ou par l'accès sélectif à la 3-céto-5α-stéroide-Δ4-deshydrogénase, possible pour la testostérone et non pour le glucuronide de testostérone. Le glucuronide de testostérone pourrait ne pénétrer que dans des cellules ou organes ne possédant pas de 3-céto-5α-stéroide-deshydrogénase. De façon plus vraisemblable, dans la même cellule, la 3-céto-5α-stéroide-Δ4-deshydrogénase microsomiale (27, 44) pourrait n'être atteinte que par des composés lipophiles (comme la testostérone) mais non par des composés hydrophiles (comme le glucuronide de testostérone). Cependant le sulfate de testostérone est transformé en sulfate de 17β-hydroxy-5α-androstane-

3-one par les microsomes de foie de rat (63). Au contraire les 3-céto-5β-stéroide-Δ4-deshydrogénases, étant des enzymes solubles, seraient accessibles à la fois à la testostérone et au glucuronide de testostérone.

II - Considérations quantitatives.

1 - La mesure des taux de production du glucuronide de testostérone et de la testostérone.

Dans l'expérience 2, le rapport $^{3}H/^{14}C$ du glucuronide de testostérone urinaire était trop bas pour permettre de calculer la conversion de la testostérone injectée en glucuronide de testostérone urinaire ni le taux de production de la testostérone. De plus, l'injection de plus de 2 mg de testostérone-^{14}C sous forme de glucuronide ne permettait pas de faire un calcul valable du taux de production du glucuronide de testostérone. Les expériences 3 et 4 ont été réalisées de façon à mesurer les contributions respectives de la testostérone et du glucuronide de testostérone circulants à la testostérone urinaire. Le poids des glucuronides de testostérone injectés était assez faible (0,2 et 0,09 mg respectivement) pour permettre le calcul des taux de production à partir de l'activité spécifique du glucuronide de testostérone urinaire, dont la masse a été mesurée par l'absorption ultraviolette à 240 mμ dans le méthanol. Le poids des composés injectés a été pris en considération dans les calculs. La

valeur trouvée a été de l'ordre de 0,4 mg/24 heures dans les deux cas. Il en ressort que la quantité de glucuronide de testostérone injectée dans les expériences 2, 3 et 5 était relativement grande et pouvait modifier l'équilibre préexistant. Cependant, au cours de l'expérience 3, où la dose injectée était très inférieure au taux de production, les résultats métaboliques ont été identiques, ce qui prouve que le "métabolisme ultérieur" du glucuronide de testostérone n'est pas un phénomène pharmacologique.

La mesure de l'activité spécifique de la testostérone urinaire a été effectuée après injection de 17β-yl glucuronide de testostérone radioactif; cette activité spécifique aurait été abaissée en présence de 3-énol glucuronide de testostérone urinaire, qui est vraisemblablement hydrolysé par la β-glucuronidase. De la sorte, le calcul du taux de production du glucuronide de testostérone aurait donné des résultats faussement élevés; le même raisonnement peut être étendu au diglucuronide de testostérone, si ce dernier ne provenait pas du 17β-yl glucuronide. C'est pourquoi, il importait de s'assurer (Chapitre II) que le 3-énol et le diglucuronide de testostérone, s'ils existent, n'ont aucune importance quantitative chez des adultes normaux.

Dans la mesure où le glucuronide de testostérone circulant est exclusivement un 17β-yl glucuronide, les études métaboliques ont une signification physiologique et il devient possible de calculer le taux de production du glucuronide de

testostérone. Encore faut-il admettre que le glucuronide de testostérone injecté par voie intraveineuse marque de façon homogène le glucuronide de testostérone formé dans le foie à partir de n'importe quel précurseur. Ce postulat a été remis en cause, en ce qui concerne la testostérone, par Lipsett (40) et Tait (34), mais il n'y a pas d'argument expérimental pour le récuser en ce qui concerne le glucuronide de testostérone. Ces considérations peuvent s'appliquer à une éventuelle formation de glucuronide de testostérone par les reins (21); mais dans ce cas les calculs pourraient être compliqués par une excrétion partielle ou totale du glucuronide de testostérone formé dans l'urine, sans passage par la circulation.

Le taux de production mesuré englobe la formation de glucuronide de testostérone, à partir de la testostérone (et éventuellement d'autres précurseurs tels que le glucuronide de 4-androstène-3α ou β,17β-diol) et le glucuronide de testostérone possiblement secrété par le testicule. Une telle secrétion n'est pas connue chez l'homme, mais elle a été démontrée chez le saumon (30). Les résultats obtenus ne sont pas en faveur d'une telle secrétion chez l'homme. En effet, le taux de production de la testostérone mesuré par la "méthode sanguine" (34), qui ne fait pas intervenir le glucuronide de testostérone, est de 7 à 9 mg/24 H. chez des hommes jeunes normaux; or le R du glucuronide de testostérone urinaire, après injection simultanée de testostérone et de glucuronide de testostérone radioactifs, est de 0,05 (Tableaux VI et VII).

Cela signifie que 0,4 $\pm$ 0,05 mg de glucuronide de testostérone sont formés à partir de la testostérone. C'est précisément la valeur que nous avons obtenue pour la production du glucuronide de testostérone, ce qui semble exclure l'existence de tout précurseur du glucuronide de testostérone autre que la testostérone elle-même.

Cependant, on ne peut exclure rigoureusement une secrétion minime de glucuronide de testostérone $<$ 0,1 mg/24 H. sur la base des résultats présentés. Or une telle secrétion suffirait à majorer considérablement le calcul du taux de production de la testostérone à partir de l'activité spécifique du glucuronide de testostérone urinaire, spécialement chez la femme.

2 - La contribution respective de la testostérone et du glucuronide de testostérone aux 5β-métabolites.

Les 5β-métabolites proviennent de la testostérone, soit directement, soit après la formation du glucuronide de testostérone. Nous avons essayé de calculer l'importance respective de ces deux voies. Dans la figure 6, les symboles suivants sont utilisés :

y = conversion de la testostérone en un métabolite urinaire

y_1 = conversion en ce métabolite par les voies autres que le glucuronide de testostérone,

y_2 = conversion en ce métabolite par l'intermédiaire du glucuronide de testostérone,

x_1 = conversion du glucuronide de testostérone en ce métabolite urinaire,

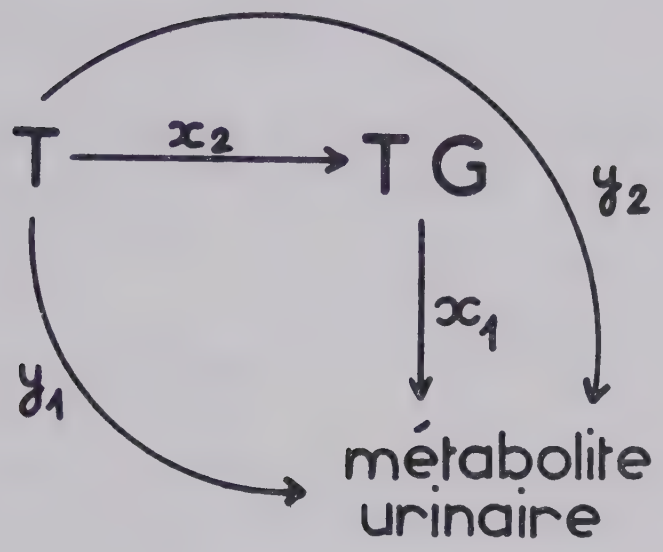
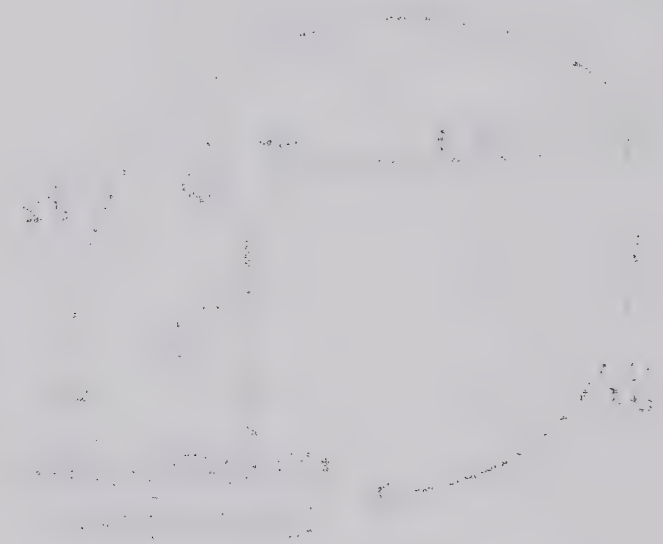


Figure .6.

Contribution respective de la testostérone et du glucuronide de testostérone à un métabolite urinaire. T : testostérone; G : glucuronide.



x_2 = conversion métabolique de la testostérone en glucuronide de testostérone.

$$y = y_1 + y_2 \; ; \; y_2 = x_1 \cdot x_2$$

Dans le cas du glucuronide de testostérone urinaire, formé à partir de la testostérone, $y_1 = 0$

$$y = y_2 = x_1 \cdot x_2 \; , \; x_2 = \frac{y}{x_1} = R_{GT} = 0{,}05$$

(valeur expérimentale du R du glucuronide de testostérone, R_{GT}, Tableaux VI et VII).

Cette valeur de x_2 est utilisée pour calculer la quantité du métabolite de la testostérone formé via le glucuronide de testostérone.

5β-androstérone :

Le R du glucuronide de 5β-androstérone (Tableaux VI et VII) est très voisin de 1. Il en résulte que $x_1 = y$.
La fraction de la 5β-androstérone formée à partir de la testostérone par l'intermédiaire du glucuronide de testostérone est :

$$\frac{y_2}{y} = \frac{x_1 \cdot x_2}{y} = x_2 = 0{,}05$$

Cela signifie que 5 p.cent seulement de la 5β-androstérone formée à partir de la testostérone proviennent du glucuronide de testostérone.

Cela souligne qu'une valeur du R de 1 (c'est à dire le

même taux de conversion de deux précurseurs en un métabolite donné, attesté par un rapport $^{3}H/^{14}C$ du métabolite identique à celui des précurseurs injectés) ne démontre pas une séquence métabolique. Ceci avait été observé précédemment (6, 7) en relation avec la séquence testostérone ⟶ androstènedione ⟶ 17-cétostéroides. La démonstration d'une "voie métabolique 17β-hydroxylée" de la testostérone avait conduit à reviser le postulat d'une conversion à 100 p.cent de la testostérone en androstènedione, affirmé d'après la valeur du R de l'androstérone urinaire.

Le 5β-androstane-3α,17β-diol :

Un calcul semblable indique qu'approximativement 25 p.cent du 5β-androstane-3α,17β-diol urinaire formé à partir de la testostérone dérivent du glucuronide de testostérone. Il avait été démontré que la plus grande part, sinon la totalité des 5α- et 5β-androstane-3α,17β-diols était formée, à partir de la testostérone, sans passage par un intermédiaire 17-cétonique (6). Les expériences présentées suggèrent que la testostérone peut être convertie en 5β-androstane-3α,17β-diol en quantité significative par l'intermédiaire du glucuronide de testostérone. Ceci pourrait expliquer que le rapport 5β/5α des androstane-3α,17β-diols soit supérieur à celui des 17-cétostéroides correspondants. Il faut à nouveau souligner que l'interprétation en termes physiologiques de tous ces taux de conversion, nommément, x_1 et y, et indirectement x_2, dépend d'un mélange homogène et complet des traceurs injectés avec les composés

naturels endogènes; s'il n'en était pas ainsi, il faudrait utiliser les symboles $y' = ay$, $x'_1 = bx_1$, a et b étant les coefficients d'entrée des composés injectés dans le, ou les, "compartiment métabolique", coefficients qui peuvent éventuellement être calculés par l'analyse du sang affluent et effluent d'un organe métabolique donné.

C H A P I T R E .IV.

METABOLISME DU GLUCURONIDE-6-^{14}C DE TESTOSTERONE-7α-^{3}H.

L'étude du métabolisme du glucuronide de testostérone marqué sur le stéroide avait conduit à supposer que le glucuronide de testostérone injecté par voie intraveineuse n'est pas hydrolysé in vivo chez l'homme. Cette conclusion était tirée de l'absence de formation de 5α-métabolites. Cependant, on ne pouvait exclure que le glucuronide de testostérone soit coupé dans un compartiment métabolique où n'existe qu'une 3-céto-5β-stéroide-Δ4-deshydrogénase. Il paraissait important d'arriver à une preuve certaine, car du point de vue physiologique, si la testostérone pouvait être libérée durant le métabolisme de son glucuronide, ce dernier pourrait être considéré comme une forme de transport de l'hormone mâle active. Si le glucuronide de testostérone n'est pas hydrolysé, il faut alors admettre qu'il est "directement" réduit par une 3-céto-5β-stéroide (glucuronide)-Δ4-deshydrogénase. Sur la base des résultats expérimentaux, la formation de 17β-yl glucuronide de 5β-androstanediol paraissait vraisemblable (Fig. 7).

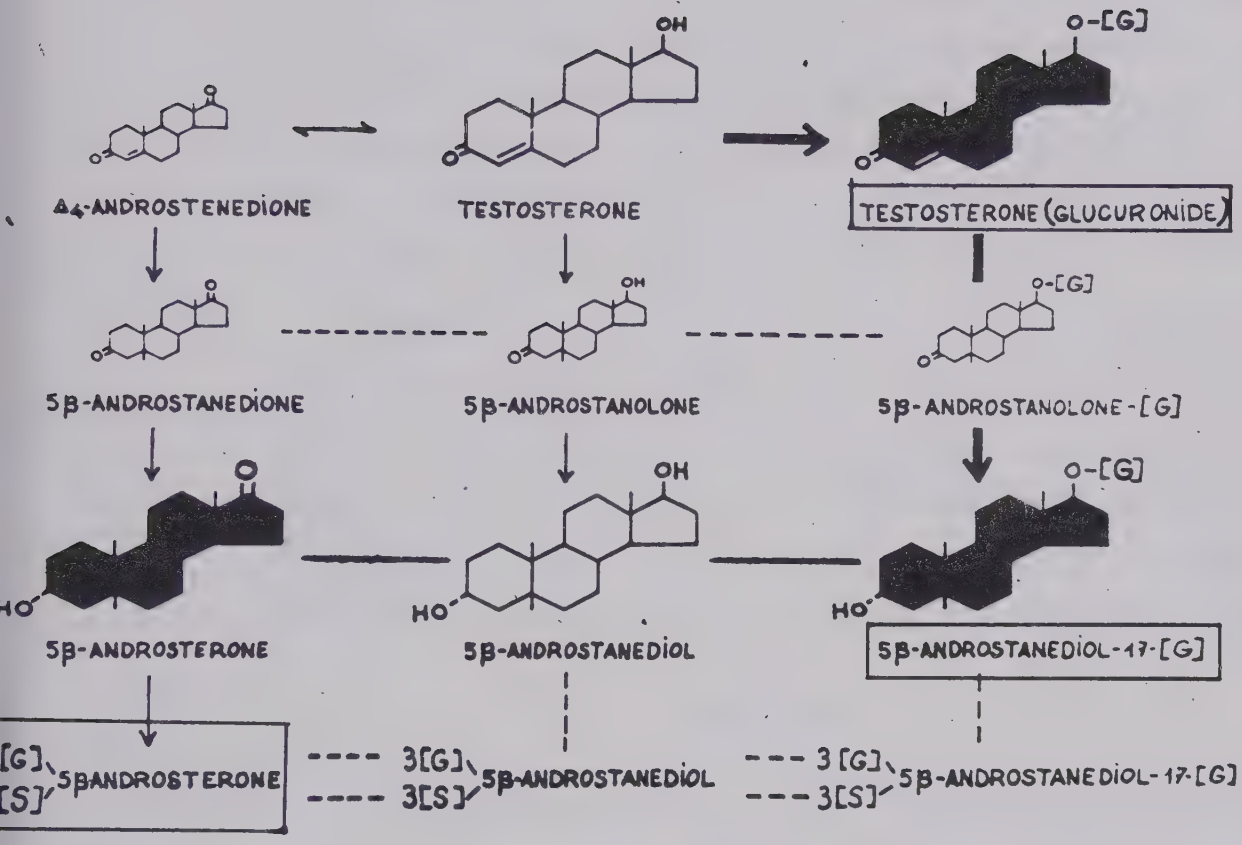


Figure .7.

Essai de représentation du métabolisme du glucuronide-^{14}C de testostérone-^{3}H.

G : glucuronide; S : sulfate.

Une démonstration définitive que l'étape initiale du métabolisme du glucuronide de testostérone peut être "directe", c'est à dire sans rupture de la liaison osidique, aurait l'intérêt théorique de démontrer que, à l'égal de certains sulfates de stéroides, les glucuronides, composés hautement polaires et acides, peuvent servir de substrat à des enzymes impliqués dans le métabolisme des stéroides.

Dans ce but, le glucuronide-6-^{14}C de testostérone-7α-^{3}H a été synthétisé et injecté par voie intraveineuse à un homme normal. Les métabolites glucuroconjugués urinaires ont été isolés. Les glucuronides de testostérone et de 5β-androstane-3α,17β-diol marqués par le ^{3}H et le ^{14}C, avec le même rapport isotopique que le composé injecté, ont été caractérisés.

METHODES

0,06 µmole de glucuronide-^{14}C de testostérone-^{3}H (1,5 µcurie de ^{3}H et 0,24 µcurie de ^{14}C) ont été injectées par voie intraveineuse à 9 heures du matin à un homme jeune normal (Expérience 7). Les urines ont été recueillies les premières 11 heures, puis pendant deux périodes consécutives de 24 heures. Seuls les deux premiers recueils d'urine ont été analysés car le troisième ne contenait pas une quantité significative de radioactivité (Tableau XIII). Le second recueil a été soumis à l'hydrolyse sélective séquentielle et les stéroides libérés analysés. Le recueil des 11 premières heures a été extrait

T A B L E A U .XIII.

L'EXCRETION DE LA RADIOACTIVITE URINAIRE

	% du tritium injecté	% du tritium excrété dans les urines des 59 heures	% du ^{14}C injecté	% du ^{14}C excrété dans les urines des 59 heures
Premier recueil d'urine (0 - 11 heures)	61	76	51	95
Deuxième recueil d'urine (11 - 35 heures)	18	22	2,6	5
Troisième recueil d'urine (35 - 59 heures)	1	2	< 0,1	< 0,1

par le mélange éther - alcool 3:1 (24) et les stéroides séparés en fractions libre, sulfate, glucuronide et polaire, sur une colonne de 400 g de Florisil, dans le système I. Les stéroides de la fraction sulfate ont été solvolysés, et une partie de la fraction glucuronide hydrolysée par la β-glucuronidase. Les systèmes de chromatographie utilisés sont décrits Chapitre I.

Le problème analytique était assez difficile en raison de la similitude des polarités des différents glucuronides. La Figure 8 donne une représentation schématique des étapes successives de la séparation des glucuronides radioactifs de testostérone, de 5β-androstanediol, et de 5β-androstérone, et de l'identification du stéroide.

RESULTATS

L'ensemble des résultats métaboliques obtenus est rassemblé dans le Tableau XIV.

1 - Séparation et identification des glucuronides radioactifs urinaires des 11 premières heures.

A - Le glucuronide de testostérone.

La fraction glucuronide de la colonne de Florisil (I) a été chromatographiée dans le système J_b. Cette chromatographie

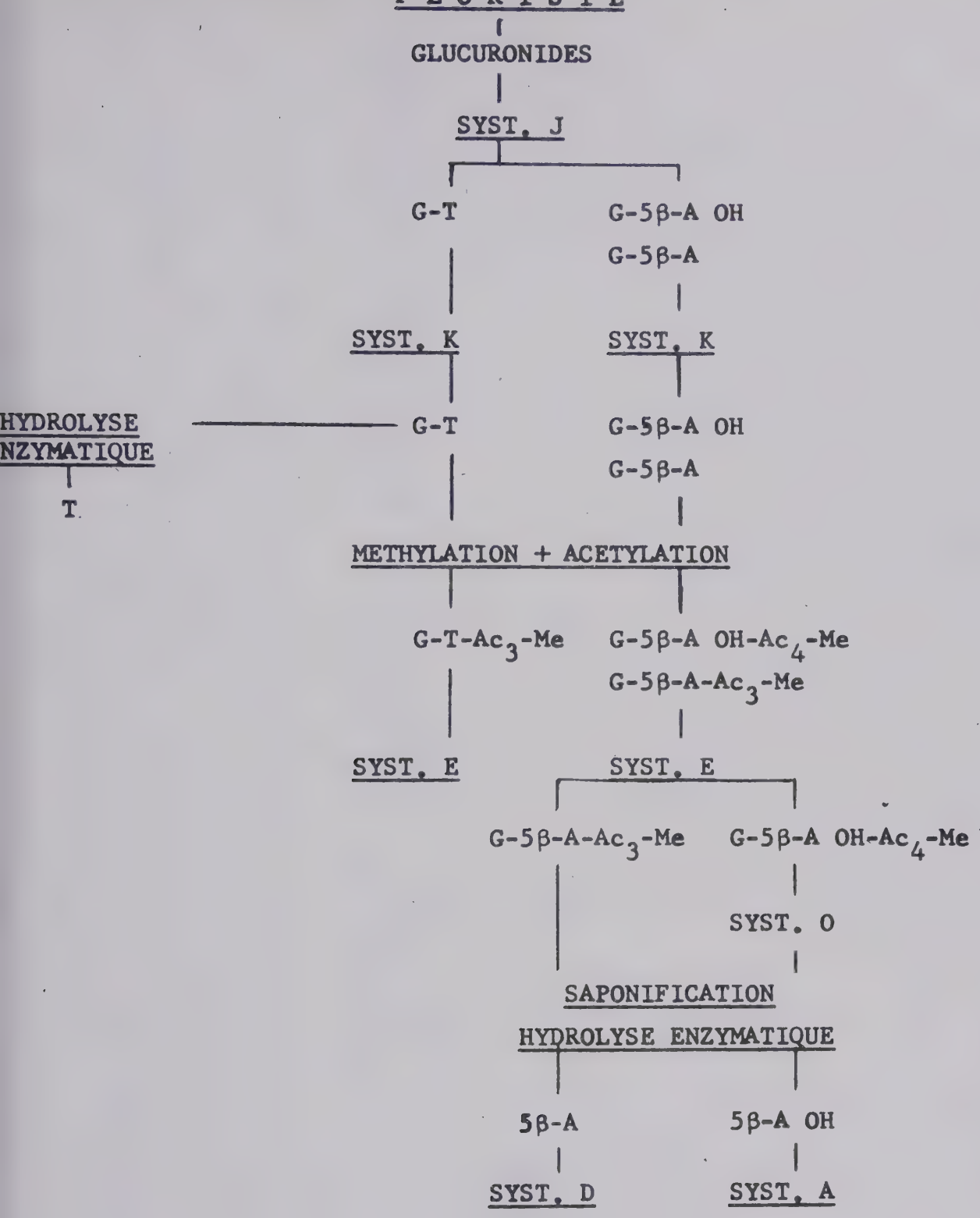


Figure 8.

Schéma du protocole analytique (Expérience 7).

T A B L E A U .XIV.

INJECTION INTRAVEINEUSE DE GLUCURONIDE-^{14}C DE TESTOSTERONE-^{3}H A UN HOMME NORMAL

Les métabolites urinaires sont exprimés en pourcentage du glucuronide de testostérone injecté : (^{14}C = 0,24 µcurie; ^{3}H = 1,50 µcurie)

	Glucuronide de testostérone		Glucuronide de 5β-androstanediol		Glucuronide de 5β-androstérone	Sulfate de 5β-androstérone
	^{3}H	^{14}C	^{3}H	^{14}C	^{3}H	^{3}H
Premier recueil d'urine (0 - 11 heures)	20,7	19,5	8,1	7,4	5,4	1,6
Deuxième recueil d'urine (11 - 35 heures)	< 0,1	-	< 0,1	-	2,9	1,8

de partage a séparé deux fractions marquées par le ^{3}H et le ^{14}C, respectivement aux 5^{e} et 7^{e} volumes de rétention. Dans la fraction la plus polaire, chaque tube avait approximativement le même rapport $^{3}H/^{14}C$, très voisin du rapport des traceurs injectés. Le rapport $^{3}H/^{14}C$ n'a pas été modifié par passage dans le système K. Une partie de ce composé a été hydrolysée par la β-glucuronidase et la testostérone-^{3}H a été caractérisée par dilution isotopique selon les modalités détaillées Tableau XV. Une partie du seul pic radioactif de la chromatographie dans le système K a été cristallisée après dilution isotopique avec du glucuronide de testostérone de référence (25) et les activités spécifiques des cristaux et de l'eau-mère étaient identiques. Une autre partie a été méthylée par le diazométhane, en solution dans le méthanol et acétylée par l'anhydride acétique, en solution dans la pyridine; le dérivé triacétylé et méthylé a été chromatographié dans le système E et identifié par cristallisation après dilution par le composé analytique de référence (25), le rapport $^{3}H/^{14}C$ était égal à celui du glucuronide de testostérone administré (Tableau XV).

B - Le glucuronide de 5β-androstanediol.

La fraction radioactive observée au 5^{e} volume de rétention de la chromatographie dans le système J_b (voir I - A) était manifestement hétérogène car le rapport $^{3}H/^{14}C$ n'était pas

T A B L E A U .XV.

PURIFICATION ET IDENTIFICATION[1] DU GLUCURONIDE-^{14}C DE TESTOSTERONE-^{3}H URINAIRE.

Protocole analytique	Radioactivité (c.p.m. x 10^{-2})		
	^{3}H	^{14}C	$^{3}H/^{14}C$
Glucuronide de testostérone injecté	7.406	2.389	3,1
Composé urinaire isolé après			
Système J	1.441	465	3,1
Système K	1.165	256	3,3
Méthylation + acétylation			
Système E	146	46	3,2
Dilution isotopique	**Activités spécifiques (c.p.m./mg)**		
Glucuronide de testostérone			
Première cristallisation[2]			
cristaux	2.718	1.032	2,7[6]
eau-mère	2.725	1.061	2,6
Deuxième cristallisation[3]			
cristaux	2.452	895	2,7
eau-mère	2.444	855	2,8
Méthyl-triacétyl glucuronide de testostérone			
Première cristallisation[4]			
cristaux	947	282	3,3
eau-mère	583	174	3,3
Deuxième cristallisation[4]			
cristaux	1.004	312	3,2
eau-mère	910	261	3,5
Troisième cristallisation[5]			
cristaux	933	307	3,0
eau-mère	1.131	345	3,3
Testostérone après hydrolyse enzymatique[7]			
Première cristallisation[5]			
cristaux	613		
eau-mère	678		
Deuxième cristallisation[5]			
cristaux	565		
eau-mère	584		

Légende du Tableau XV.

1 : Les autres données chromatographiques et chimiques contribuant à l'identification des composés sont données dans le texte.

2 : Eau.

3 : Méthanol - eau.

4 : Benzène - isooctane.

5 : Acétone - isooctane.

6 : Le comptage a été réalisé après addition de 1 ml de méthanol à 5 ml de toluène scintillant; la correction de l'atténuation n'a pas été réalisée.

7 : 2,6 mg de l'eau-mère de la première cristallisation du glucuronide de testostérone ont été hydrolysés par la β-glucuronidase (Kétodase) et 11,2 mg de testostérone ont été ajoutés.

constant dans les tubes successifs du pic; aucune séparation nette n'a été obtenue dans le système K. C'est pourquoi, une méthylation par le diazométhane suivie d'acétylation par l'anhydride acétique a été réalisée, et, après chromatographie dans le système E (Fig. 9) deux pics radioactifs ont été obtenus, le moins polaire étant seul marqué à la fois par le ^{3}H et le ^{14}C. Le composé du pic le moins polaire a été chromatographié à deux reprises dans le système O et le rapport $^{3}H/^{14}C$ est demeuré constant dans les différents tubes du pic et très voisin du rapport $^{3}H/^{14}C$ des traceurs injectés; la dilution isotopique n'a pu être réalisée faute de 17β-yl glucuronide de 5β-androstanediol analytique de référence. Après saponification par la soude méthanolique et hydrolyse par la β-glucuronidase, le 5β-androstanediol-^{3}H libéré a été chromatographié dans les systèmes A et G. Un seul composé radioactif a été observé; la cristallisation après dilution isotopique par du composé pur de référence a montré l'égalité des activités spécifiques des cristaux et de l'eau-mère (Tableau XVI). La présence de 4-androstène-3α ou β,17β-diol a été exclue par traitement par la dichlorodicyanoquinone (48), étant donné l'absence de formation de testostérone radioactive à la suite de cette oxydation spécifique des alcools allyliques.

- C - Le glucuronide de 5β-androstérone-^{3}H.

Le pic le plus polaire de la chromatographie des glucuronides acétylés et méthylés dans le système E (1 - B)

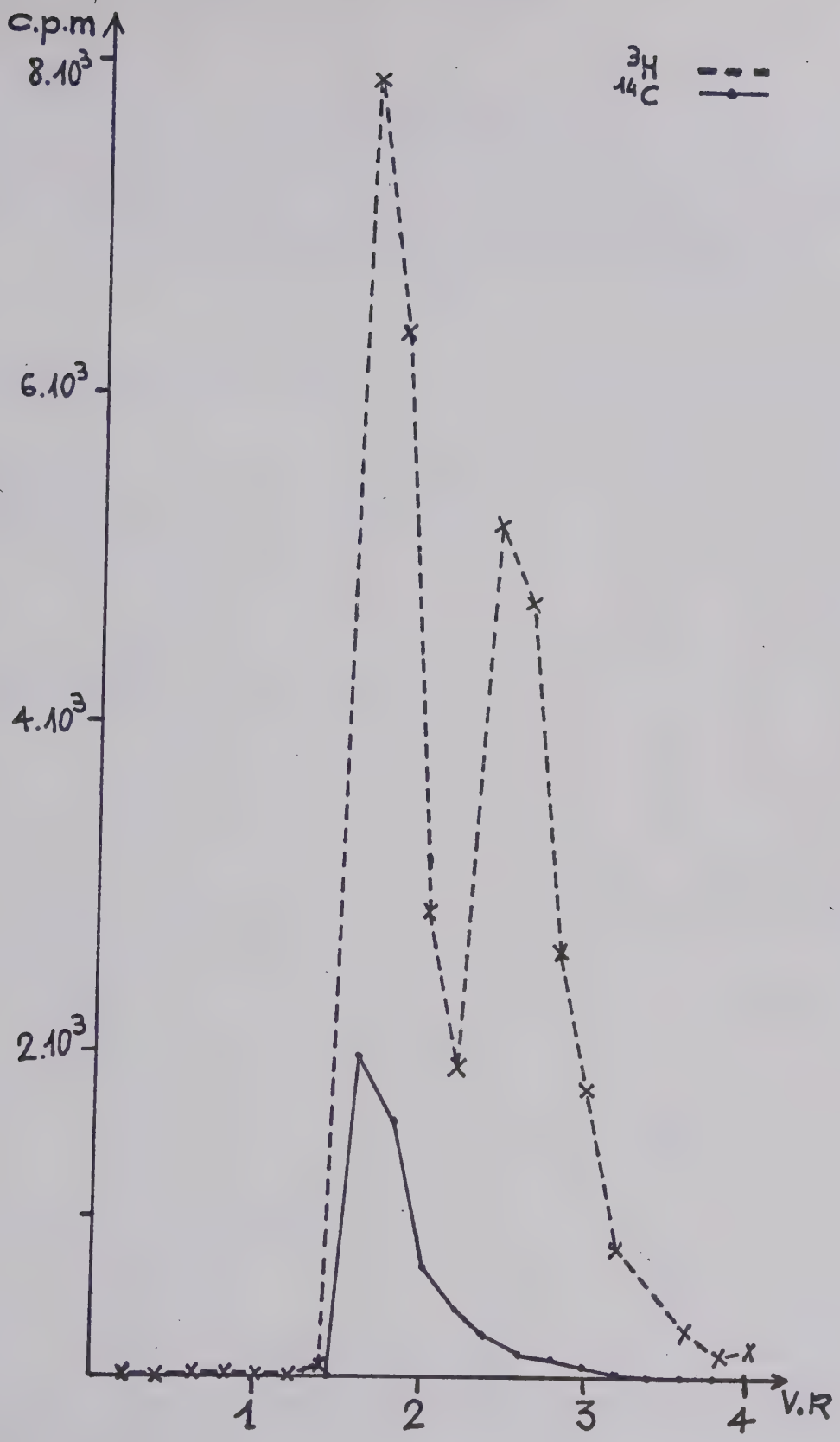


Figure .9.

Séparation des glucuronides de 5β-androstanediol (doublement marqué) et de 5β-androstérone (tritié), après méthylation et acétylation (système E).

T A B L E A U .XVI.

PURIFICATION ET IDENTIFICATION[1] DU GLUCURONIDE-^{14}C DE 5β-ANDROSTANE-3α,17β-DIOL-^{3}H URINAIRE

Protocole analytique	Radioactivité (c.p.m. x 10^{-2})		
	^{3}H	^{14}C	$^{3}H/^{14}C$
Glucuronide de testostérone injecté	7.406	2.389	3,1
raction chromatographique isolée après :			
Système J	1.005	177	5,7
Système K	682	113	6,0
Méthylation + acétylation			
Système E	172	41	4,1
Système O	175	51	3,4
Système O	91	27	3,4

Dilution isotopique	Activités spécifiques (c.p.m./mg)
5β-androstanediol après ydrolyse enzymatique	
Première cristallisation[2]	
cristaux	206
eau-mère	210
Deuxième cristallisation[2]	
cristaux	206
eau-mère	199

1 : Les autres données chromatographiques et chimiques contribuant à l'identification des composés sont données dans le texte.
2 : Acétone - méthanol.

(Fig. 9) était seulement marqué par le tritium. Il a été saponifié par la soude méthanolique et hydrolysé par la β-glucuronidase. Un seul composé, la 5β-androstérone-^{3}H, a été obtenu après chromatographie dans le système D. Son identité a été confirmée par chromatographie sur papier (système F) et par cristallisation après dilution isotopique par le corps pur de référence (Tableau XVII). Il n'a pas été observé de composé radioactif ayant la polarité de la 17β-hydroxy-5β-androstane-3-one au cours de la chromatographie sur papier (système F).

2 - Le sulfate de 5β-androstérone dans les urines des 11 premières heures.

Le seul stéroide radioactif identifié après la solvolyse de la fraction sulfate de la colonne de Florisil était la 5β-androstérone-^{3}H. Elle représentait 90 p.cent du tritium de cette fraction. Après chromatographie dans le système A, la cristallisation après dilution isotopique a confirmé son homogénéité radiochimique (Tableau XVII).

3 - Les composés "polaires" des 11 premières heures d'urine.

De la radioactivité, représentant approximativement 12 p.cent du ^{3}H et 10 p.cent du ^{14}C injectés, a été éluée de la colonne de Florisil après la fraction glucuronide. Lors de la

T A B L E A U .XVII.

IDENTIFICATION DE LA 5β-ANDROSTERONE URINAIRE

	Activités spécifiques (c.p.m./mg)	
	cristaux	eau-mère
5β-androstérone (glucuronide)[1]		
Première cristallisation[2]	329	321
Deuxième cristallisation[2]	307	289
5β-androstérone (sulfate)[1]		
Première cristallisation[2]	899	629
Deuxième cristallisation[2]	865	857

1 : Métabolites isolés après hydrolyse sélective du glucuronide et du sulfate (Chap. I, 1).
2 : Acétone - isooctane.

pas été mesurées par dilution isotopique inversée. Le glucuronide et le sulfate de 5β-androstérone-^{3}H continuent à être excrétés dans le deuxième recueil d'urine.

DISCUSSION

Cette expérience confirme que 20 p.cent seulement du glucuronide de testostérone administré sont excrétés inchangés dans l'urine et que le métabolisme ultérieur est caractérisé par la formation de métabolites ayant exclusivement la structure 5β.

1 - Absence d'hydrolyse du glucuronide de testostérone injecté.

Aux erreurs expérimentales près, le rapport $^{3}H/^{14}C$ du glucuronide de testostérone isolé de l'urine et cristallisé en tant que glucuronide de testostérone et en tant que dérivé triacétylé et méthylé est identique au rapport des traceurs injectés. Cependant, compte tenu du fait que 5 p.cent seulement de la testostérone libre injectée sont convertis en glucuronide de testostérone dans l'organisme (Chapitre IV, Discussion II-2), une hydrolyse de 36 p.cent du glucuronide de testostérone injecté n'entrainerait une variation du rapport $^{3}H/^{14}C$ du glucuronide de testostérone urinaire que de 3,1 à 3,3. En effet

si nous appelons H et C les quantités de ^{3}H et de ^{14}C injectées exprimées en c.p.m., H:C = 3,1. Si nous appelons x la fraction du glucuronide de testostérone éventuellement hydrolysée dans le "compartiment métabolique général", la quantité de tritium incorporée à nouveau dans le glucuronide de testostérone par la reconjugaison de la testostérone sera

$$H \cdot x \cdot 0,05.$$

Le nouveau rapport $^{3}H:^{14}C$ s'écrira :

$$\frac{H(1 - x) + H \cdot x \cdot 0,05}{C(1 - x)} = 3,3$$

En substituant la valeur H:C = 3,1 et en résolvant l'équation, on obtient la valeur x = 0,56. La précision de la mesure du rapport $^{3}H/^{14}C$ ne permet pas de conclure qu'un écart aussi faible (de 3,1 à 3,3) soit significatif).

2 - Conversion métabolique "directe" du glucuronide de testostérone en 17β-yl glucuronide de 5β-androstanediol

La mise en évidence de glucuronide-^{14}C de 5β-androstanediol-^{3}H dans les urines, est une démonstration d'un métabolisme "direct" du glucuronide de testostérone sans rupture de la liaison osidique, d'autant plus que le rapport $^{3}H/^{14}C$ est pratiquement identique à celui des traceurs injectés. On ne peut affirmer que la légère augmentation du rapport $^{3}H/^{14}C$

soit significative. Si on lui accorde de la valeur, il pourrait s'agir comme précédemment d'une hydrolyse partielle du glucuronide de testostérone. Il pourrait aussi s'agir d'une hydrolyse du 17β-yl glucuronide-^{14}C de 5β-androstanediol-^{3}H suivie de reconjugaison en C-3. En effet, nous avons préparé du 3β-yl glucuronide de 5β-androstanediol-17α-^{3}H par action du borotritiure sur le glucuronide de 5β-androstérone, et nous avons observé qu'il n'aurait pas été séparé du 17β-yl glucuronide par le protocole analytique utilisé; dans ces conditions, si après hydrolyse et réduction du glucuronide-^{14}C de testostérone-^{3}H injecté ou hydrolyse du 17β-yl glucuronide-^{14}C de 5β-androstanediol formé, le 5β-androstanediol-^{3}H avait été conjugué en C-3 ou en C-17, le rapport $^{3}H/^{14}C$ aurait été majoré, une reconjugaison avec l'acide glucuronique-^{14}C étant très improbable. On ne peut dire dans quelle mesure le rapport $^{3}H/^{14}C$ aurait augmenté, car le taux de conversion métabolique du 5β-androstanediol en glucuronide de 5β-androstanediol n'est pas connu. Le 5β-androstanediol est excrété dans les urines conjugué à l'acide glucuronique, puisqu'il est libéré par l'action de la β-glucuronidase. Plusieurs précurseurs du 5β-androstanediol ont été décrits (11). En ce qui concerne la testostérone, approximativement 25 p.cent du 5β-androstanediol qui en dérive sont formés par l'intermédiaire du glucuronide de testostérone (Chapitre III, Discussion II - 2). La persistance du double marquage dans le glucuronide de 5β-androstanediol urinaire, après injection de glucuronide-^{14}C de testosté-

rone-^{3}H, indique de plus qu'il s'agit d'un 17β-yl glucuronide, puisque le transfert de la copule glucuronique de C-17 en C-3 sans dilution isotopique semble impossible; l'absence de ^{14}C dans le glucuronide de 5β-androstérone-^{3}H est un argument supplémentaire pour cette interprétation. Il en résulte qu'au moins 25 p.cent du 5β-androstanediol formé à partir de la testostérone sont un 17β-yl glucuronide. On ne sait si le reste du glucuronide de 5β-androstanediol est constitué de 3- ou de 17-glucuronide.

Finalement, le 5β-androstanediol est formé, à partir du glucuronide de testostérone, préférentiellement ou totalement, selon la voie "directe" glucuroconjuguée; ceci implique que des enzymes, 3-céto-5β-stéroide-Δ4-déshydrogénase et 3α-hydroxystéroide déshydrogénase acceptent des glucuronides de stéroides pour substrats.

Pour juger dans quelle mesure l'aptitude des glucuronides de stéroides à servir de substrats aux enzymes du métabolisme des stéroides est un phénomène général, nous avons demandé à E. Milgrom d'étudier l'action du β-enzyme de Pseudomonas Testosteroni (β-hydroxystéroide déshydrogénase, Type I, Sigma Chemical Company) sur des substrats glucuronides. Il a observé que les 3-glucuronides de 5-androstène-3β,17β-diol et de 5β-androstanediol peuvent servir de substrats à l'enzyme. Cette action du β-enzyme sur le glucuronide de 5β-androstanediol sera mise à profit pour discriminer entre une conjugaison en

C-3 et en C-17. En effet, sous l'action de l'enzyme, le 3-glucuronide sera converti en 3-glucuronide de 5β-androstérone, alors que le 17-glucuronide demeurera inchangé. Il sera alors possible de séparer chromatographiquement les deux stéroides conjugués obtenus à partir du (ou des) glucuronide(s) de 5β-androstanediol urinaire(s) et d'identifier le stéroide après hydrolyse enzymatique.

De l'ensemble des expériences réalisées, il ressort que la formation de 5β-androstanediol est plus grande à partir du glucuronide de testostérone qu'à partir de la testostérone. Il reste à déterminer si la cause en réside dans des enzymes différents, dans une plus grande affinité du glucuronide pour le même enzyme, ou dans l'absence de formation d'autres métabolites (par exemple les 5α-métabolites) à partir du glucuronide. Dans tous les cas, la réduction du noyau A du stéroide semble rapide, puisque tout le glucuronide de 5β-androstanediol est pratiquement excrété dans l'urine dès les premières heures suivant l'injection des traceurs.

3 - Formation du glucuronide et du sulfate de 5β-androstérone-^{3}H.

Théoriquement, du 17-énol glucuronide de 5β-androstérone pourrait être formé par deshydrogénation du glucuronide de 5β-androstanediol. Cette possibilité a été soigneusement exclue,

car on n'a pas observé de 5β-androstérone après l'hydrolyse du pic radioactif contenant les méthyl-tétracétyl glucuronides de dihydroxystéroides (Résultats 1 - B).

Le glucuronide de 5β-androstérone-^{3}H isolé étant un 3α-yl glucuronide, il y a donc eu à un certain stade, une hydrolyse du C-17 glucuronide et une oxydation du 17β-hydroxyl. Les résultats présentés ne sont pas en faveur d'une hydrolyse du glucuronide de testostérone dans un compartiment spécial, où la testostérone ne donnerait que des 5β-métabolites. Il semble plus vraisemblable que l'hydrolyse soit survenue après une ou plusieurs étapes de métabolisme "direct". Ce pourrait être au stade du glucuronide de 17β-OH-5β-androstane-3-one, un intermédiaire probable (Fig. 7) ou au stade du glucuronide de 5β-androstanediol, le stéroide libéré étant ensuite oxydé en C-17 et reconjugué en C-3; on peut également supposer la formation de 3-sulfate ou de 3-glucuronide du 17-glucuronide de 5β-androstanediol, précédant l'hydrolyse du 17-glucuronide et la deshydrogénation, aboutissant à la formation de sulfate et de glucuronide de 5β-androstérone respectivement (Fig. 7). Ces doubles conjugués n'ont pas été trouvés dans les urines, mais en raison de leur très grande polarité on peut concevoir qu'ils aient été retenus dans les organes métaboliques, et ceci pourrait expliquer l'excrétion persistante de 5β-androstérone dans le deuxième recueil d'urine, alors que celle du 5β-androstanediol était pratiquement achevée (Tableau XIII).

En résumé, la formation de 5β-androstérone à partir du glucuronide de testostérone implique, tôt ou tard, une rupture de la liaison osidique mais, en tout cas, la testostérone libre n'est pas mise en circulation, dans le "compartiment métabolique général". L'excrétion de glucuronide de 5β-androstérone-^{3}H dans l'urine est un phénomène plus lent que celle du glucuronide-^{14}C de 5β-androstanediol-^{3}H, et l'excrétion du sulfate est plus faible et plus prolongée encore.

Ces résultats ne sont guère en faveur d'un rôle de transport de l'hormone mâle active dévolu au glucuronide de testostérone, au moins chez l'homme normal. Il pourrait en être autrement dans des situations pathologiques, en particulier au cours de tumeurs malignes hormono-dépendantes. A l'heure actuelle, la signification physiologique du métabolisme ultérieur du glucuronide de testostérone demeure obscure.

C H A P I T R E .V.

LE METABOLISME DU GLUCURONIDE DE DEHYDROEPIANDROSTERONE-7α-^{3}H.

Ce travail montre que 15 p.cent seulement du glucuronide de déhydroépiandrostérone radioactif, administré à des taux physiologiques, sont excrétés inchangés et qu'il existe un métabolisme ultérieur du glucuronide de déhydroépiandrostérone. Les résultats sont en faveur d'un métabolisme partiellement "direct", sans rupture de la liaison osidique - et partiellement "indirect", impliquant une hydrolyse du glucuronide. De plus, le taux de formation du sulfate de déhydroépiandrostérone à partir du glucuronide de déhydroépiandrostérone (par comparaison avec le sulfate de déhydroépiandrostérone formé à partir de la déhydroépiandrostérone) ne peut s'expliquer que par une "transconjugaison" qui pourrait être soit "chimique" ou seulement "physiologique"; en conséquence, les conditions du calcul des taux de production de la déhydroépiandrostérone doivent être remises en discussion.

METHODES

1 - Injection.

Au cours des expériences 8 et 9, respectivement 0,6 µcurie (0,01 µmole) et 0,7 µcurie (0,01 µmole) de déhydroépiandrostérone-4-^{14}C, et 7 µcuries (0,6 µmole) et 9 µcuries (0,7 µmole) de glucuronide de déhydroépiandrostérone-7α-^{3}H ont été administrés (Tableau IV). Les urines des quatre jours suivants ont été recueillies.

2 - Hydrolyses et extractions.

Elles ont été réalisées sur la moitié des urines de 4 jours. Les valeurs en c.p.m. des fractions chromatographiques des Tableaux XX p.102, XXI p.104, et XXV p.111 sont rapportées à la totalité de l'extrait et non à la diurèse des 4 jours.

Dans l'expérience 8, les stéroides ont été séparés en fraction "sulfate" et "glucuronide" par hydrolyse sélective séquentielle; comme il existe un risque, en dépit des précautions prises, qu'une hydrolyse spontanée ou bactérienne des glucuronides urinaires survienne avant l'extraction, et qu'ainsi les stéroides libérés soient englobés dans la fraction dite "sulfate", et comme le rapport $^{3}H/^{14}C$ du sulfate de déhydroépiandrostérone urinaire a une importance cruciale pour l'interprétation des résultats, le protocole analytique a été amélioré dans l'expérience 9; les stéroides libres, les sulfates et les glucuronides ont été extraits par le mélange éther - alcool 3:1 (24) et séparés sur colonne de Florisil dans le système I. La fraction glucuronide a été hydrolysée par la

β-glucuronidase de suc d'Helix Pomatia L. La fraction sulfate a été convertie en sulfates mixtes de pyridinium et de stéroide selon McKenna (45), extraits par le chloroforme, puis soumis à la solvolyse. Ce sont les stéroides libérés dans ces conditions que nous appellerons "glucuronides" et "sulfates". Les résultats obtenus par ces deux protocoles analytiques sont d'ailleurs, comme nous le verrons, identiques. Cependant, au cours de l'expérience 9, l'effort d'identification des métabolites n'a été effectué que pour ceux qui présentaient un intérêt particulier pour la discussion. Aussi les résultats expérimentaux complets et en particulier les tables des détails expérimentaux ne seront données que pour l'expérience 8; les différences trouvées au cours de l'expérience 9 seront données dans le texte.

RESULTATS

L'ensemble des résultats expérimentaux des expériences 8 et 9 est représenté respectivement dans les Tableaux XVIII et XIX.

1 - Le glucuronide de déhydroépiandrostérone.

Les composés cétoniques de la fraction glucuronide ont été chromatographiés dans le système E; la fraction de l'éluat correspondant à la 5β-androstérone et à la déhydroépiandrosté-

T A B L E A U .XVIII.

INJECTION INTRAVEINEUSE DE DEHYDROEPIANDROSTERONE-^{14}C ET DE GLUCURONIDE DE DEHYDROEPIANDROSTERONE-^{3}H A UNE FEMME NORMALE

(Expérience 8)

Métabolites urinaires[2]	conversion de[1] la déhydroépi-androstérone-^{14}C	conversion du glucuronide de déhydroépian-drostérone-^{3}H	R[3]
ndrostérone (sulfate)	1,1	0,1	0,1
ndrostérone (glucuronide)	3,9	0,4	0,1
β-androstérone (sulfate)	0,6	0,2	0,3
β-androstérone (glucuronide)	3,2	2,4	0,7
éhydroépiandrostérone (sulfate)	0,6	0,5	0,8
éhydroépiandrostérone (glucuronide)	-[4]	14,4	∞
β-OH-5α-androstan-17-one (sulfate)	-	-	0,4
β-OH-5α-androstan-17-one (glucuronide)	-	-	-
β-OH-5β-androstan-17-one (sulfate)	0,1	0,4	2,9
β-OH-5β-androstan-17-one (glucuronide)	-	0,1	∞
-androstène-3β,17β-diol (glucuronide)	-	1,0	∞
ndrostane-3β,17β-diol (glucuronide)	-	0,8	∞
β-androstane-3β,17β-diol (glucuronide)	-	0,3	∞
ndrostane-3α,17β-diol (glucuronide)	0,1	0,1	0,9
β-androstane-3α,17β-diol (glucuronide)	0,4	1,0	2,4

Taux de production du glucuronide de déhydroépiandrostérone : 0,7 mg/24 H.

1 : Pourcentage de conversion du composé injecté en le métabolite urinaire.
2 : Métabolites isolés après hydrolyse sélective des sulfates et glucuronides (Chap. I, 1).
3 : Pour la définition du R voir Chap. I, 4.
4 : Non mesurable.

T A B L E A U XIX.

INJECTION INTRAVEINEUSE DE DEHYDROEPIANDROSTERONE-^{14}C ET DE GLUCURONIDE DE DEHYDROEPIANDROSTERONE-^{3}H CHEZ UN HOMME NORMAL

(Expérience 9)

Métabolites urinaires[2]	conversion de[1] la déhydroépi-androstérone-^{14}C	conversion du glucuronide de déhydroépian-drostérone-^{3}H	R[3]
drostérone (sulfate)	0,6	0,1	0,1
drostérone (glucuronide)	4,6	0,7	0,1
-androstérone (sulfate)	1,1	0,9	0,8
-androstérone (glucuronide)	4,8	4,0	0,8
éhydroépiandrostérone (sulfate)	0,1	0,1	0,8
éhydroépiandrostérone (glucuronide)	-[4]	16,2	∞
-OH-5α-androstan-17-one (sulfate)	-	-	-
-OH-5α-androstan-17-one (glucuronide)	-	0,3	∞
-OH-5β-androstan-17-one (sulfate)	-	-	-
-OH-5β-androstan-17-one (glucuronide)	-	0,4	∞
-androstène-3β,17β-diol (glucuronide)	-	0,6	∞
drostane-3β,17β-diol (glucuronide)	-	0,6	∞
-androstane-3β,17β-diol (glucuronide)	-	-	-
drostane-3α,17β-diol (glucuronide)	-	-	-
-androstane-3α,17β-diol (glucuronide)	0,4	0,3	0,9

Taux de production du glucuronide de déhydroépiandrostérone : 0,4 mg/24 H.

1 : Pourcentage de conversion du composé injecté en le métabolite urinaire.
2 : Métabolites isolés après hydrolyse sélective des sulfates et glucuronides (Chap. I, 1).
3 : Pour la définition du R voir Chap. I, 4.
4 : Non mesurable.

rone a été rechromatographiée dans le système A. La déhydroépiandrostérone isolée contenait trop peu de ^{14}C pour qu'il puisse être mesuré valablement en présence de grandes quantités de ^{3}H.

La déhydroépiandrostérone-^{3}H a été caractérisée par chromatographie sur papier dans le système F (qui permet de séparer l'épiandrostérone), suivie après élution par le méthanol de chromatographie sur colonne dans le système D; la cristallisation après dilution isotopique d'une partie du seul pic radioactif a permis d'identifier la déhydroépiandrostérone-^{3}H (Tableau XX). L'activité spécifique de la partie restante, mesurée à l'aide d'une micro-réaction de Zimmermann (14), a été utilisée pour le calcul du taux de production du glucuronide de déhydroépiandrostérone.

De façon à s'assurer qu'il ne restait pas d'épiandrostérone-^{3}H mélangée à la déhydroépiandrostérone-^{3}H après les chromatographies dans les systèmes E, A et F, une époxydation a été réalisée à l'aide d'acide métachloroperbenzoïque. Le 5,6-époxyde de déhydroépiandrostérone-^{3}H a été obtenu et contrôlé par chromatographie dans les systèmes A, D et F.

Enfin, pour s'assurer que le pic de déhydroépiandrostérone-^{3}H élué du système A ne contenait pas de 3β- ou 3α-hydroxy-4-androstène-17-one, une oxydation par la dichlorodicyanoquinone a été effectuée de façon à convertir les alcools allyliques en cétones conjuguées; la 3α- ou 3β-4-androstène-17-one aura été transformée en 4-androstène-3,17-dione, la déhydroépi-

T A B L E A U .XX.

PURIFICATION ET IDENTIFICATION DU GLUCURONIDE DE DEHYDROEPIANDROSTERONE URINAIRE.

(Expérience 8)

Protocole analytique	Radioactivité (c.p.m. x 10^{-2})		
	^{3}H	^{14}C	$^{3}H/^{14}C$
Déhydroépiandrostérone injectée		6.480	
Glucuronide de déhydroépiandrostérone injecté	45.958		7,1
Composé urinaire isolé après hydrolyse enzymatique			
Système E	4.102	116	35
Système A	3.032	4	> 100
Système F (R_t^1 = 1,0)			
Système D	531	1	> 100
Oxydation par le DDQ[2]			> 100
Epoxydation[3]			> 100

Dilution isotopique	Activités spécifiques (c.p.m./mg)		
Cristallisation[4]			
cristaux	392	0	> 100
eau-mère	381	1	> 100

1 : Composé de référence : déhydroépiandrostérone.
2 : Un seul pic radioactif ayant la polarité de la déhydroépiandrostérone dans le système D.
3 : Traces de matériel non epoxydable (probablement l'épiandrostérone) outre un composé ayant la polarité du 5,6-epoxyde de déhydroépiandrostérone dans les systèmes A et D.
4 : Benzène - isooctane.

androstérone demeurant inchangée; on n'a pas décelé de 4-androstène-3,17-dione radioactive par chromatographie dans le système F.

2 - Le sulfate de déhydroépiandrostérone.

Les sulfates cétoniques ont été chromatographiés sur colonne d'alumine (système A). Le second des 4 pics radioactifs a été rechromatographié sur papier (système F) et la déhydroépiandrostérone-^{3}H-^{14}C a été séparée d'une petite zone radioactive de polarité correspondant à l'épiandrostérone. Après élution de la zone de la déhydroépiandrostérone par le méthanol, une partie de la déhydroépiandrostérone radioactive a été passée sur une colonne de silica gel (système P) et l'identité contrôlée par cristallisation après dilution isotopique (Tableau XXI). Une autre partie a été traitée par l'acide métachloroperbenzoïque et la formation de 5,6-epoxy-déhydroépiandrostérone a été constatée.

3 - Les autres glucuronides de 3β-hydroxystéroides.

Plusieurs 3β-hydroxystéroides ont été observés dans la fraction glucuronide; ils contenaient du tritium et peu ou pas de ^{14}C.

T A B L E A U .XXI.

PURIFICATION ET IDENTIFICATION DU SULFATE DE DEHYDROEPIANDROSTERONE URINAIRE.

(Expérience 8)

Protocole analytique	Radioactivité (c.p.m. x 10^{-2})		
	^{3}H	^{14}C	$^{3}H/^{14}C$
Déhydroépiandrostérone injectée		6.480	
Glucuronide de déhydroépiandrostérone injecté	45.958		7,1
Composé urinaire isolé après solvolyse			
Système A	102	18	5,5
Système F (R_t^1 = 1,0)			
Système H	46	10	4,6
Epoxydation[2]	10	2	4,9
Dilution isotopique	Activités spécifiques (c.p.m./mg)		
Première cristallisation[3]			
cristaux	33	7	4,7
eau-mère	40	9	4,4
Deuxième cristallisation[3]			
cristaux	31	6	5,6
eau-mère	42	9	4,5
Troisième cristallisation[3]			
cristaux	29	7	4,3
eau-mère	33	6	5,5

1 : Composé de référence : déhydroépiandrostérone.
2 : Un seul composé radioactif ayant la polarité du 5,6-epoxyde de déhydroépiandrostérone dans le système F.
3 : Méthanol - benzène.

A - La 3β-hydroxy-5β-androstane-17-one.

Le pic le moins polaire de la chromatographie des glucuronides cétoniques dans le système E a été rechromatographié sur alumine (système A), ce qui a permis la séparation de l'androstérone et de la 3β-hydroxy-5β-androstane-17-one radioactives; cette dernière a été identifiée par cristallisation après dilution isotopique (Tableau XXII).

B - La 3β-hydroxy-5α-androstane-17-one (épiandrostérone).

L'époxydation de la fraction déhydroépiandrostérone (voir 1) a été répétée deux fois dans l'expérience 10 et un composé-^{3}H non epoxydable, ayant la polarité de l'épiandrostérone dans le système F, a été détecté.

C - Le 5-androstène-3β,17β-diol.

La chromatographie sur colonne d'alumine (système A) des glucuronides non cétoniques comportait plusieurs pics de radioactivité. Le second par ordre de polarité croissante avait la mobilité du 5-androstène-3β,17β-diol sur papier (système G) et sur colonne de célite (système D). La cristallisation après dilution isotopique de l'effluent radioactif de cette colonne a confirmé qu'il s'agissait de 5-androstène-3β,17β-diol (Tableau XXIII).

T A B L E A U .XXII.

DENTIFICATION DE LA 3β-OH-5β-ANDROSTANE-17-ONE (GLUCURONIDE) URINAIRE

(Expérience 8)

	Activités spécifiques (c.p.m./mg)	
	^{3}H	^{14}C
Théorique[1]	240	-[3]
Première cristallisation[2]		
cristaux	193	
eau-mère	259	
Deuxième cristallisation		
cristaux	210	
eau-mère	244	
Troisième cristallisation		
cristaux	214	
eau-mère	234	

1 : Valeur non corrigée pour la masse de 3β-OH-5β-androstane-17-one endogène.
2 : Méthanol - eau.
3 : Très bas $<$ 10 c.p.m./mg.

T A B L E A U .XXIII.

IDENTIFICATION DU 5-ANDROSTENE-3β,17β-DIOL (GLUCURONIDE) URINAIRE

(Expérience 9)

	Activités spécifiques (c.p.m./mg)	
	^{3}H	^{14}C
Théorique[1]	174	-[3]
Première cristallisation[2]		
cristaux	176	-
eau-mère	194	-
Deuxième cristallisation[2]		
cristaux	152	-
eau-mère	170	-

1 : Valeur non corrigée pour la masse de 5-androstène-3β,17β-diol endogène.
2 : Méthanol.
3 : Très bas < 10 c.p.m./mg.

D - 5β-androstane-3β,17β-diol.

Le composé le moins polaire de la chromatographie dans le système A (voir C) avait la migration du 5β-androstane-3β, 17β-diol dans le système G. Faute de matériel l'identification n'a pu être poursuivie.

E - 5α-androstane-3β,17β-diol.

Le troisième pic radioactif de la colonne d'alumine (voir C) a été chromatographié sur colonne de célite (système D) et le 5α-androstane-3α,17β-diol a été séparé de l'isomère 3β; ce dernier a été identifié par chromatographie sur papier (système G) et par cristallisation après dilution isotopique (Tableau XXIV).

4 - Les autres sulfates de 3β-hydroxystéroides.

A - La 3β-hydroxy-5β-androstane-17-one.

Le composé le moins polaire de la chromatographie dans le système A des sulfates cétoniques avait la mobilité de la 3β-hydroxy-5β-androstane-17-one. Il n'a été détecté que dans l'expérience 8, et l'identification n'a pas pu être complétée (Tableaux XVIII et XIX).

T A B L E A U .XXIV.

IDENTIFICATION DE L'ANDROSTANE-3β,17β-DIOL (GLUCURONIDE) URINAIRE

(Expérience 8)

	Activités spécifiques (c.p.m./mg)	
	^{3}H	^{14}C
Théorique[1]	330	-[4]
Première cristallisation[2]		
cristaux	299	-
eau-mère	326	-
Deuxième cristallisation[3]		
cristaux	294	-
eau-mère	284	-

1 : Valeur non corrigée pour la masse d'androstane-3β,17β-diol endogène.
2 : Méthanol - benzène.
3 : Benzène - isooctane.
4 : Très bas < 10 c.p.m./mg.

B - La 3β-hydroxy-5α-androstane-17-one (épiandrostérone).

Après la chromatographie sur papier (système F) du pic de déhydroépiandrostérone des sulfates cétoniques (voir 2), la zone de l'épiandrostérone a été éluée; un essai d'epoxydation a été négatif et la chromatographie sur célite dans le système acétate d'éthyle - isooctane - méthanol - eau, 7:16:18:3, a confirmé que le stéroide isolé avait la polarité de l'épiandrostérone (expérience 8 seulement, Tableau XVIII).

5 - Les 3α-hydroxy-17-cétostéroides.

A - Les glucuronides de 5β-androstérone et d'androstérone.

Après la chromatographie des glucuronides cétoniques dans le système E (voir 1), les stéroides des pics radioactifs contenant la 5β-androstérone (et la déhydroépiandrostérone) et l'androstérone ont été rechromatographiés séparément dans le système A. La 5β-androstérone et l'androstérone radioactives ainsi isolées ont été identifiées par chromatographie sur papier (système F) et par cristallisation après dilution isotopique (Tableau XXV).

B - Les sulfates de 5β-androstérone et d'androstérone.

Les 3^{e} et 4^{e} pics de radioactivité, dans l'ordre de polarités croissantes, observés lors de la chromatographie dans le

PURIFICATION ET IDENTIFICATION DES GLUCURONIDES DE 5α- ET 5β-ANDROSTERONE URINAIRES

(Expérience 8)

	Radioactivité (c.p.m. x 10^{-2})					
	Androstérone			5β-androstérone		
	^{3}H	^{14}C	$^{3}H/^{14}C$	^{3}H	^{14}C	$^{3}H/^{14}C$
Protocole analytique						
Système E	135	79	1,7	557	100	5,6
Système A	81	86	0,9	492	89	5,5
Système F[1] (a)	45	58	0,8	(b) 209	62	3,4
Dilution isotopique	Activités spécifiques (c.p.m./mg)					
Première cristallisation[2]						
cristaux	280	339	0,8	833	163	5,1
eau-mère	341	387	0,9	1.170	227	5,0
Deuxième cristallisation[2]						
cristaux	226	327	0,7	803	155	5,2
eau-mère	232	343	0,7	715	139	5,1
Troisième cristallisation[2]						
cristaux	-[3]	-	-	725	141	5,1
eau-mère	-	-	-	839	157	5,3

1 : R_t = 1 Composés de référence : a) androstérone; b) 5β-androstérone.
2 : Méthanol - eau.
3 : Non mesuré.

système A des sulfates cétoniques ont été identifiés par chromatographie sur papier (système F) et, après purification dans le système D, par cristallisation après dilution isotopique (Tableau XXVI).

6 - Les 3α,17β-dihydroxystéroides.

A - Le 5β-androstane-3α,17β-diol.

Les glucuronides non cétoniques ont été chromatographiés dans le système A. Le stéroide du pic le plus polaire a été purifié dans le système D, et le 5β-androstanediol a été identifié par cristallisation après dilution isotopique (Tableau XXVII).

B - L'androstane-3α,17β-diol.

Il a été séparé de l'isomère 3β (voir 3, C et E) par chromatographie dans le système D, et avait la migration de l'androstanediol dans le système G. L'identification n'a pas pu être complétée.

T A B L E A U .XXVI.

PURIFICATION ET IDENTIFICATION DES GLUCURONIDES DE 5α- ET 5β-ANDROSTERONE URINAIRES

(Expérience 8)

Radioactivité (c.p.m. x 10^{-2})

	Androstérone			5β-androstérone		
	^{3}H	^{14}C	$^{3}H/^{14}C$	^{3}H	^{14}C	$^{3}H/^{14}C$
Protocole analytique						
Système A	38	30	1,2	47	15	3,0
Système F^{1} (a)	5	7	0,7	(b) 6	4	1,7
Système D	5	9	0,5	17	11	1,5
Dilution isotopique	Activités spécifiques (c.p.m./mg)					
Première cristallisation[2]						
cristaux	21	43	0,5	104	65	1,6
eau-mère	27	39	0,7	120	69	1,7
Deuxième cristallisation						
cristaux	-[3]	-	-	108	61	1,8
eau-mère	-	-	-	112	77	1,5

1 : R_t = 1 Composés de référence : a) androstérone; b) 5β-androstérone.
2 : Méthanol - eau
3 : Non mesuré

T A B L E A U .XXVII.

IDENTIFICATION DU 5β-ANDROSTANE-3α,17β-DIOL (GLUCURONIDE) URINAIRE.

(Expérience 8)

	Activités spécifiques (c.p.m./mg)	
	^{3}H	^{14}C
Théorique[1]	510	12
Cristallisation[2]		
cristaux	489	9
eau-mère	485	18

1 : Valeur non corrigée pour la masse de 5β-androstane-3α,17β-diol endogène.
2 : Méthanol - eau.

DISCUSSION

1 - Excrétion, production et métabolisme ultérieur du glucuronide de déhydroépiandrostérone.

Seulement 15 p.cent d'une dose physiologique de glucuronide de déhydroépiandrostérone injectée par voie intraveineuse sont excrétés dans les urines. Ce résultat est comparable à celui observé avec le glucuronide de testostérone. La mise en évidence de nombreux métabolites urinaires du glucuronide de déhydroépiandrostérone indique qu'il ne s'agit pas d'un phénomène lié à la voie d'excrétion, mais qu'il y a effectivement un métabolisme ultérieur du glucuronide de déhydroépiandrostérone. Kellie avait déjà décrit le métabolisme ultérieur du glucuronide de déhydroépiandrostérone : après injection intraveineuse de 25 mg de glucuronide de déhydroépiandrostérone, il en avait retrouvé environ 50 p.cent inchangé dans l'urine et une augmentation de l'androstérone et de la 5β-androstérone urinaires (22). La masse de glucuronide de déhydroépiandrostérone administrée peut expliquer la plus grande proportion excrétée, puisque le pourcentage d'excrétion du sulfate de déhydroépiandrostérone augmente lorsque le taux de production s'élève (43).

Le taux de production du glucuronide de déhydroépiandrostérone endogène (exprimé en déhydroépiandrostérone) est de

0,7 mg/jour dans l'expérience 8 (chez une femme de 23 ans) et de 0,4 mg/jour dans l'expérience 9 (chez un homme de 32 ans). Le rapport $^{3}H/^{14}C$ du glucuronide de déhydroépiandrostérone urinaire était trop élevé pour permettre un calcul de la conversion métabolique de la déhydroépiandrostérone en glucuronide de déhydroépiandrostérone. Cependant, si l'on retient les valeurs normales du taux de production de la déhydroépiandrostérone dans les deux sexes (42), on peut estimer à 5-10 p.cent la conversion métabolique de la déhydroépiandrostérone en glucuronide de déhydroépiandrostérone, valeur comparable à ce qui avait été observé pour la testostérone (Chapitre III, Discussion II - 1). Cette estimation n'est valable que s'il n'existe aucune autre source de glucuronide de déhydroépiandrostérone (telle qu'une "secrétion" du glucuronide de déhydroépiandrostérone par une glande endocrine, ou une production métabolique à partir d'un précurseur qui ne passe pas par la déhydroépiandrostérone, comme par exemple le glucuronide de 5-androstène-3β,17β-diol).

2 - Le métabolisme "direct" du glucuronide de déhydroépiandrostérone.

Plusieurs glucuronides de 3β-hydroxystéroides, marqués par le ^{3}H et non par le ^{14}C ont été identifiés : 3β-hydroxy-5β-androstane-17-one, épiandrostérone, 5-androstènediol, 5β-androstane-3β,17β-diol et 5α-androstane-3β,17β-diol. A la fois

leur structure et leur conjugaison indiquent que, selon toute vraisemblance, leur formation à partir du glucuronide de déhydroépiandrostérone ne comporte pas un passage par la déhydroépiandrostérone libre. Les objections que comporte une telle affirmation ont déjà été discutées Chapitre III. Pour les surmonter, il faudrait, comme il a été fait pour le glucuronide de testostérone, réaliser la synthèse de glucuronide-^{14}C de déhydroépiandrostérone-^{3}H. Après des essais infructueux, il ne nous a pas été possible de préparer du glucuronide de déhydroépiandrostérone doublement marqué pur. Le glucuronide de 5-androstènediol pourrait être formé par l'action d'une 17β-deshydrogénase sur le glucuronide de déhydroépiandrostérone (Fig. 10a). Une telle activité a été démontrée in vitro par E. Milgrom, qui a réalisé ce travail sous notre direction. L'hydroxystéroide déshydrogénase de Pseudomonas Testosteroni (Type I, Sigma Chemical Company), a été utilisée. Les incubations ont été réalisées en tampon phosphate à pH 8,9 avec le DPN comme cofacteur. La formation de $DPNH_2$ après addition des 3-glucuronides de 5-androstène-3β,17β-diol ou de 5β-androstanediol a été retenue comme critère de l'activité enzymatique. Après hydrolyse enzymatique, les stéroides 17-cétoniques formés ont été identifiés. La réduction "directe" d'un 17-cétostéroide conjugué avait déjà été démontrée chez l'homme, à partir du sulfate de déhydroépiandrostérone (3).

La formation des glucuronides de 3β-hydroxy-5β-androstane-17-one et d'épiandrostérone conduit à postuler la réduction du

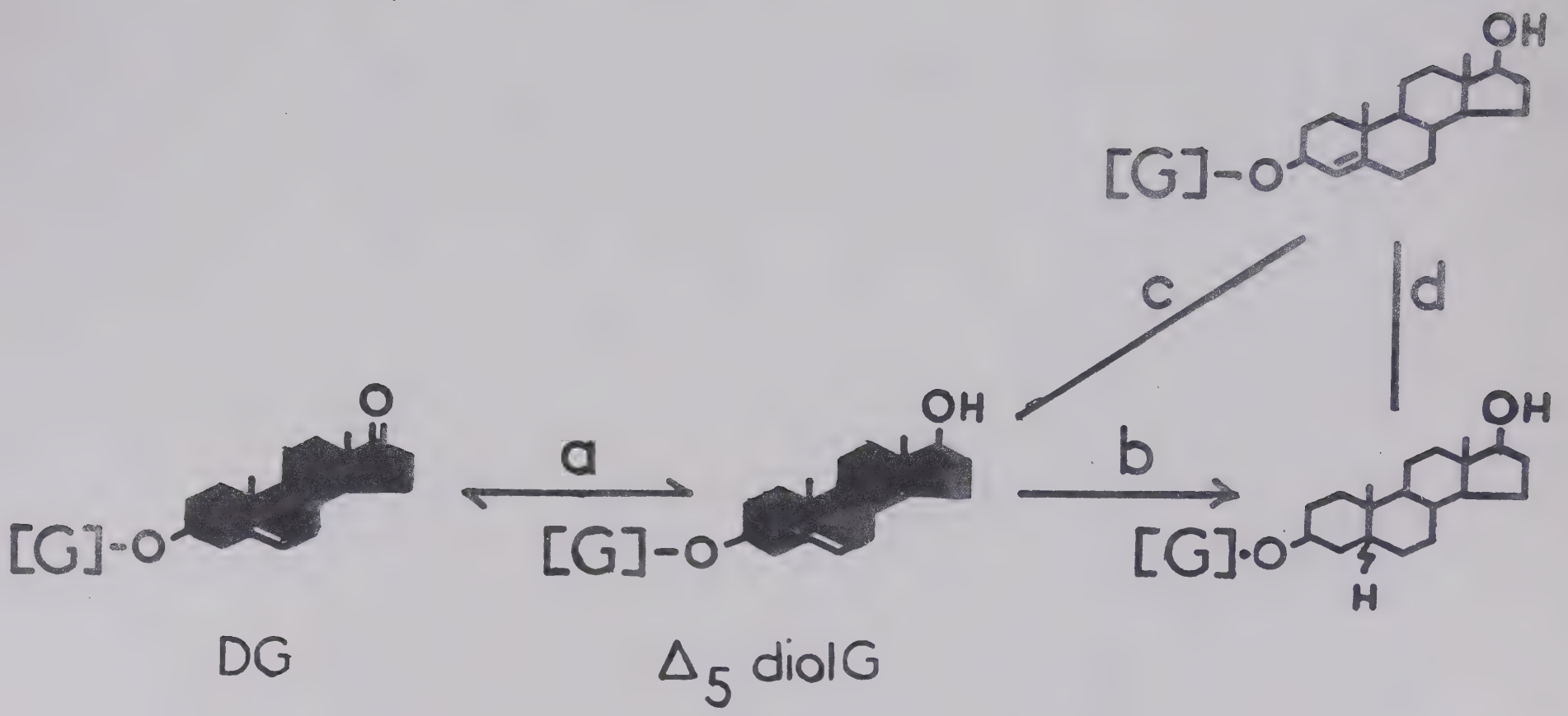


Figure .10.

Possible métabolisme direct du glucuronide de déhydroépiandrostérone (17β-réduction initiale). DG : glucuronide de déhydroépiandrostérone; Δ_5 diolG : glucuronide de 5-androstène-3β,17β-diol.

glucuronide de déhydroépiandrostérone par une Δ5-5β- et une Δ5-5α-réductase (Fig. 11b). L'existence de telles activités enzymatiques est purement hypothétique; la recherche d'une telle activité à partir de déhydroépiandrostérone-3α-^{3}H (12) a été négative : les sulfates de 3β-hydroxy-5β-androstane-17-one et d'épiandrostérone ne contenaient que peu ou pas de tritium. Nous avons confirmé ce fait après injection intraveineuse à un homme normal de sulfate de déhydroépiandrostérone-3α-^{3}H-4-^{14}C. Le sulfate de déhydroépiandrostérone-3α-^{3}H a été obtenu par action du complexe SO_3-pyridine (2) sur la déhydroépiandrostérone-3α-^{3}H due à l'obligeance de D. Fukushima. Après conversion en sel d'ammonium, le sulfate de déhydroépiandrostérone-3α-^{3}H a été purifié dans le système J_b. Il a été mélangé à du sulfate de déhydroépiandrostérone-4-^{14}C. Après solvolyse et oxydation chromique il a été vérifié que le ^{3}H disparait presque complètement (rapport $^{3}H/^{14}C$ = 0,1).

Les urines des quatre jours suivant l'injection ont été traitées par solvolyse et action du réactif T de Girard de façon à obtenir une fraction "sulfates cétoniques". Par chromatographie dans le système t-butanol - isooctane - méthanol - eau, 2:10:7:1, un seul pic radioactif contenant à la fois du ^{3}H et du ^{14}C a été observé. Les tubes de ce pic ont été rassemblés, évaporés, et chromatographiés dans le système A où de nouveau un seul pic contenant à la fois du ^{3}H et du ^{14}C a

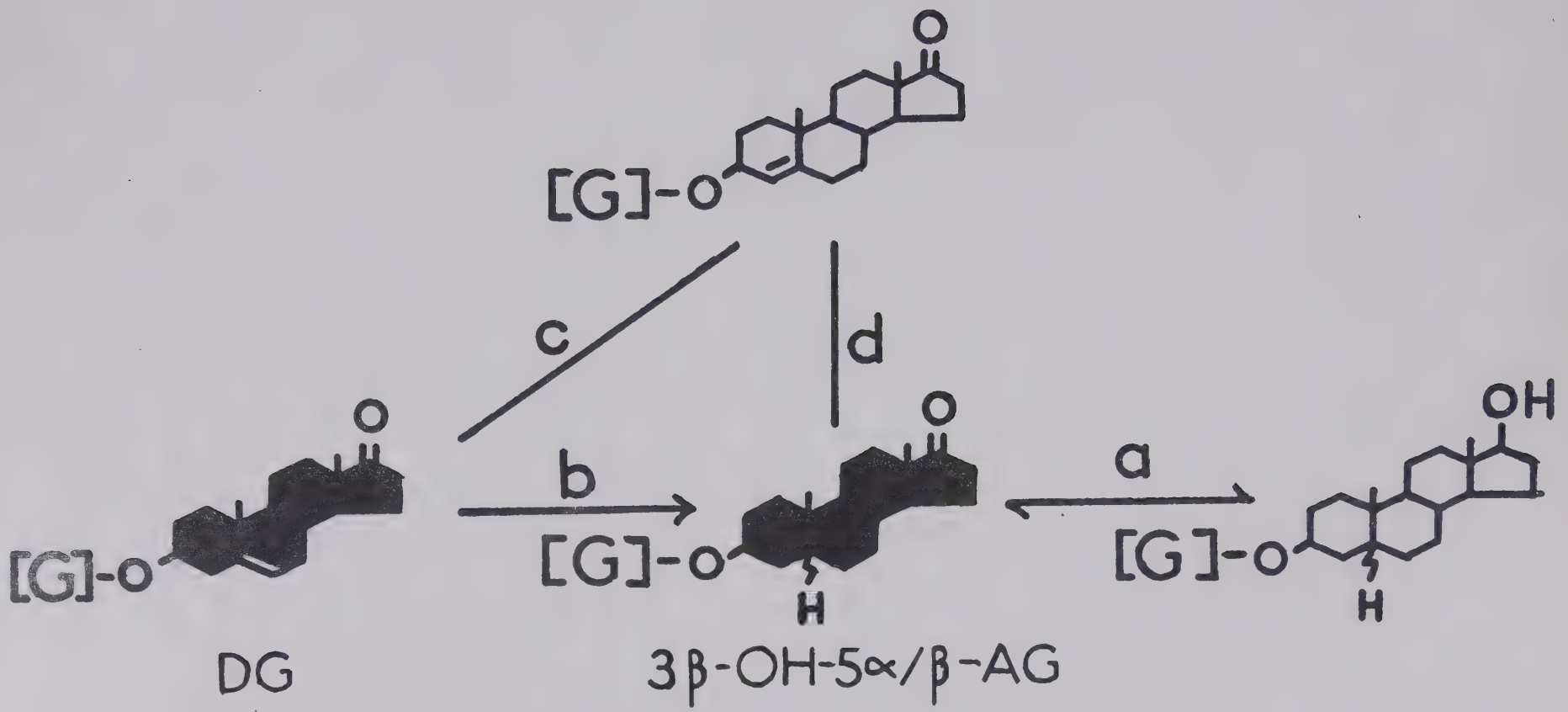


Figure .11.

Possible métabolisme direct du glucuronide de déhydroépiandrostérone (réduction initiale de la double liaison Δ4-5). DG : glucuronide de déhydroépiandrostérone; 3β-OH-5α/β-AG : glucuronides de 3β-hydroxy-5α ou 5β-androstane-17-one.

été observé. Les tubes de ce pic ont été rassemblés et le composé obtenu a été soumis à l'epoxydation par l'acide méta-chloroperbenzoïque. Par chromatographie dans le système D, deux pics radioactifs ont été obtenus. Le pic le plus polaire correspondait au 5,6-epoxyde de déhydroépiandrostérone avec un rapport $^{3}H/^{14}C$ de 5,9. Le pic le moins polaire avait la polarité de l'épiandrostérone avec un rapport $^{3}H/^{14}C$ de 0,5. Une nouvelle epoxydation a été réalisée, de façon à éliminer des traces éventuelles de déhydroépiandrostérone, et après nouvelle chromatographie dans le système D et cristallisation après dilution isotopique, de l'épiandrostérone avec un rapport $^{3}H/^{14}C$ de 0,5 a été identifiée. Une partie des cristaux de la dernière cristallisation a été soumise à l'oxydation chromique, et après chromatographie dans les systèmes F et P, la 5α-androstane-3,17-dione obtenue avait un rapport $^{3}H/^{14}C$ de 0,3.

On peut donc conclure que, au cours de la conversion métabolique du sulfate de déhydroépiandrostérone-3α-^{3}H-4-^{14}C en sulfate d'épiandrostérone, le rapport $^{3}H/^{14}C$ est passé de 5,9 à 0,5, ce qui montre que le métabolisme "direct" sans passage par un intermédiaire 3-cétonique représente au plus 9 p.cent et vraisemblablement moins de 5 p.cent si l'on tient compte de la persistance du ^{3}H après oxydation chromique.

En ce qui concerne le glucuronide de déhydroépiandrostérone, il est possible qu'une Δ5→Δ4-3β-hydroxystéroide (glucuronide) isomérase (Fig. 11c) agisse couplée avec une Δ4-réductase (Fig. 11d); cependant les Δ5→Δ4 isomérases et les

Δ4-5α- et Δ4-5β-réductases n'ont été décrites que pour les 3-cétostéroides (27,35,44). D'autres voies métaboliques seront discutées plus loin, toutefois elles sont encore plus incertaines que la réduction directe de la double liaison. Il faut enfin souligner que, si les sulfates d'épiandrostérone et de 3β-hydroxy-5β-androstane-17-one ont été isolés de l'urine humaine, les glucuronides correspondants n'ont pas été décrits et sont donc présents en très faibles quantités; ceci confirme que la production de glucuronide de déhydroépiandrostérone est très faible.

Si l'on considère les glucuronides de 5α-androstane-3β, 17β-diol et de 5β-androstane-3β,17β-diol, ils pourraient résulter de la réduction successive de la double liaison et de la 17-cétone, quel que soit l'ordre des deux réactions (Fig. 10, ab ou acd et Fig. 11, ba ou cda).

3 - La formation des 3α-hydroxy-17-cétostéroides.

La formation des 3α-hydroxy-17-cétostéroides, métabolites du glucuronide de déhydroépiandrostérone, implique une série d'étapes intermédiaires. La voie la plus simple est l'hydrolyse par la β-glucuronidase endogène, suivie par le métabolisme classique de la déhydroépiandrostérone libérée, donnant la 4-androstène-3,17-dione et les quatre isomères 3α- ou 3β-hydroxy-5α- ou 5β-androstane-17-dione (Fig. 12). Par conséquent

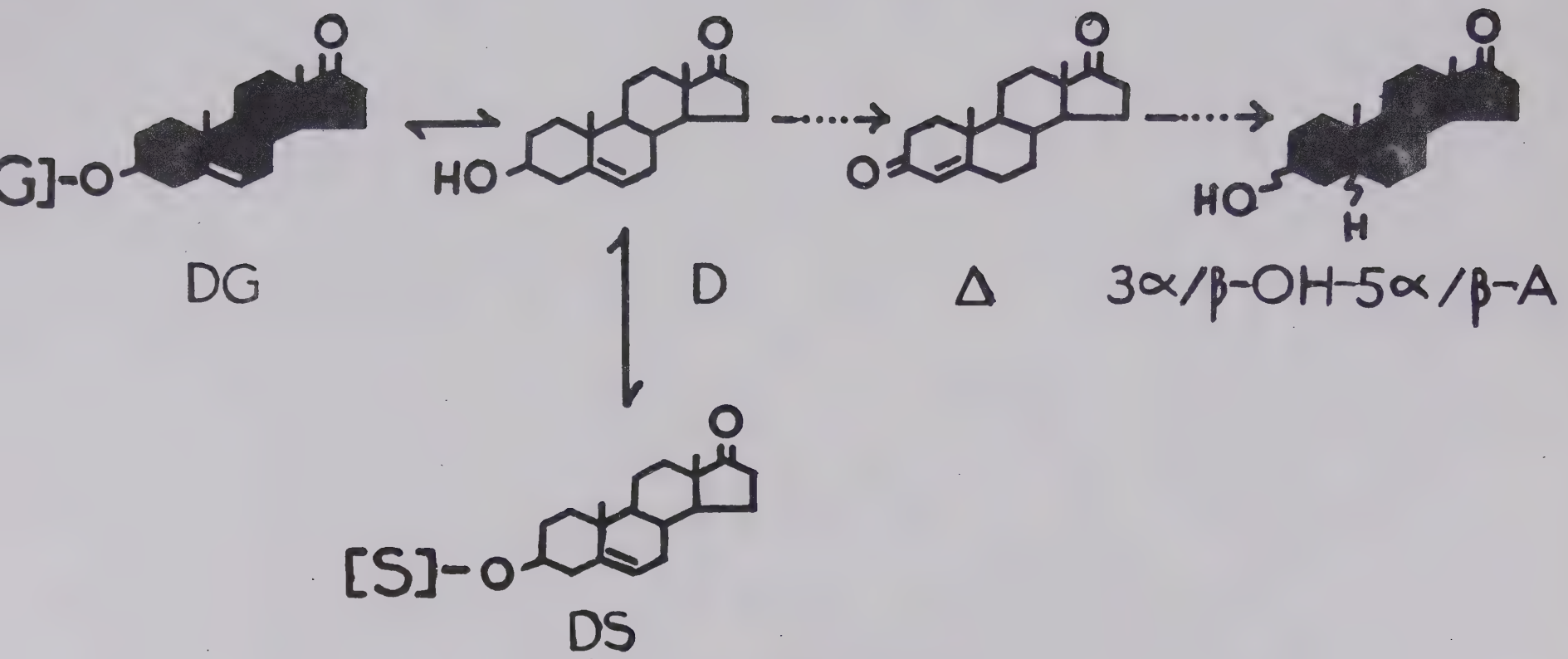


Figure .12.

Possible métabolisme indirect du glucuronide de déhydroépiandrostérone (DG).
Δ : 4-androstène-3,17-dione; 3α/β-OH-5α/β-A : 3α ou 3β-hydroxy-5α ou 5β-androstane-17-one.
G : glucuronide; S : sulfate.

ces métabolites, qu'ils soient sulfo- ou glucuro-conjugués, dérivent du même intermédiaire, la déhydroépiandrostérone, et devraient avoir d'une part le même facteur de conversion (R), et d'autre part ce facteur devrait être inférieur à 1. Seule cette dernière condition est observée en fait, et par contre le R de la 5β-androstérone est très supérieur à celui de l'androstérone (Tableaux XIV et XV).

Deux sortes d'explication de ces résultats peuvent être avancées. Dans la première, la (ou les) voies métaboliques conduisant du glucuronide de déhydroépiandrostérone aux 3α-hydroxy-17-cétostéroides ne passent pas par la déhydroépiandrostérone ni même par la 4-androstènedione (Fig. 13). Un métabolisme "initialement direct" du glucuronide de déhydroépiandrostérone pourrait consister en une réduction de la 17-cétone (Fig. 10, a) et conduire ensuite au glucuronide de testostérone; le métabolisme de ce composé est connu et offre l'avantage d'expliquer la prépondérance des 5β-métabolites. Un autre type de métabolisme "direct" du glucuronide de déhydroépiandrostérone pourrait consister dans la réduction de la double liaison (Fig. 11, b). Enfin un dernier type de métabolisme "direct" pourrait inclure la formation de 3-énol glucuronide de 4-androstène-3,17-dione (Fig. 13, e). Toutes ces voies métaboliques, qui postulent un métabolisme "initialement direct" du glucuronide de déhydroépiandrostérone sont strictement hypothétiques. Dans la deuxième sorte d'explication, la voie chimique classique est suivie : glucuronide de déhydroépiandrostérone →

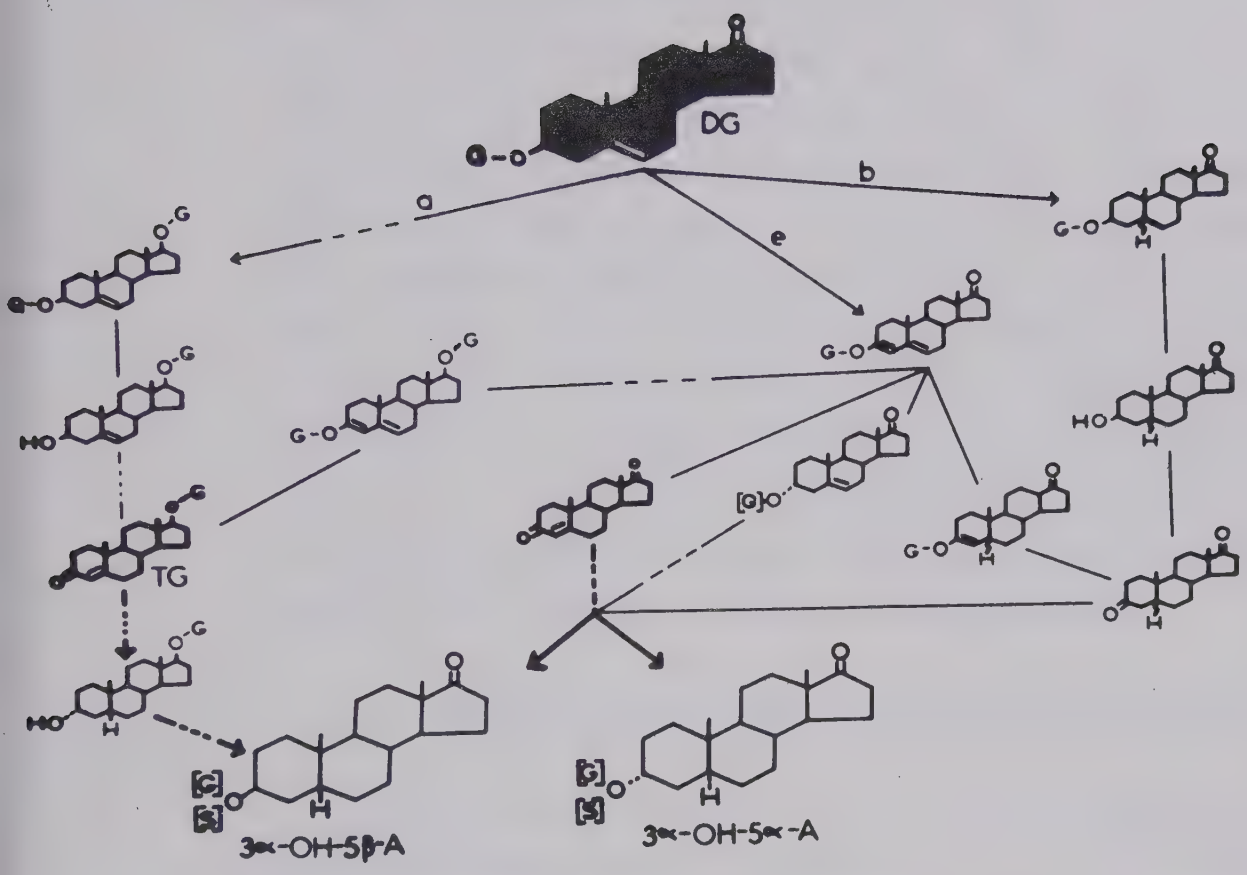


Figure .I3.

Possibles voies métaboliques (initialement directes) entre le glucuronide de déhydroépiandrostérone (DG) et les 5α et 5β-androstérone. TG : glucuronide de testostérone ; 3α-OH-5β-A : 5β-androstérone ; 3α-OH-5α-A : androstérone ; G : glucuronide ; S : sulfate.

déhydroépiandrostérone ⟶ 5α- et 5β-androstérone; toutefois, la déhydroépiandrostérone libérée de son glucuronide ne se mélange pas avec la déhydroépiandrostérone libre circulante: elles se distribuent dans des organes différents, ou différentes cellules du ou des mêmes organes, ou même dans différentes structures subcellulaires des mêmes cellules. Dans ces différents "compartiments", le rapport 5α/5β des métabolites de la déhydroépiandrostérone peut être différent, et à l'extrême aucune 5α-androstérone pourrait n'être formée dans le compartiment où entre le glucuronide de déhydroépiandrostérone (Fig. 14). La différence de métabolisme dans cette acception serait dûe à une distribution physiologique différente de la déhydroépiandrostérone libre circulante et de la déhydroépiandrostérone libérée au cours du métabolisme.

4 - La formation de 5α- et 5β-androstane-3α,17β-diol.

Les facteurs R du 5α- et du 5β-androstanediol sont élevés, particulièrement celui du métabolite 5β. La contribution respective du glucuronide de déhydroépiandrostérone et de la déhydroépiandrostérone aux androstanediols par rapport aux 17-cétostéroides conduit au même type de discussion que leur contribution à la 5β-androstérone par rapport à l'androstérone. Cette conversion relativement élevée du glucuronide de déhydroépiandrostérone en 17β-hydroxystéroides est analogue à celle du sulfate de déhydroépiandrostérone, même par comparaison avec la testostérone (11); le même dilemme demeure posé : faut-il invoquer les compartiments du métabolisme ou des voies métaboliques inconnues ?

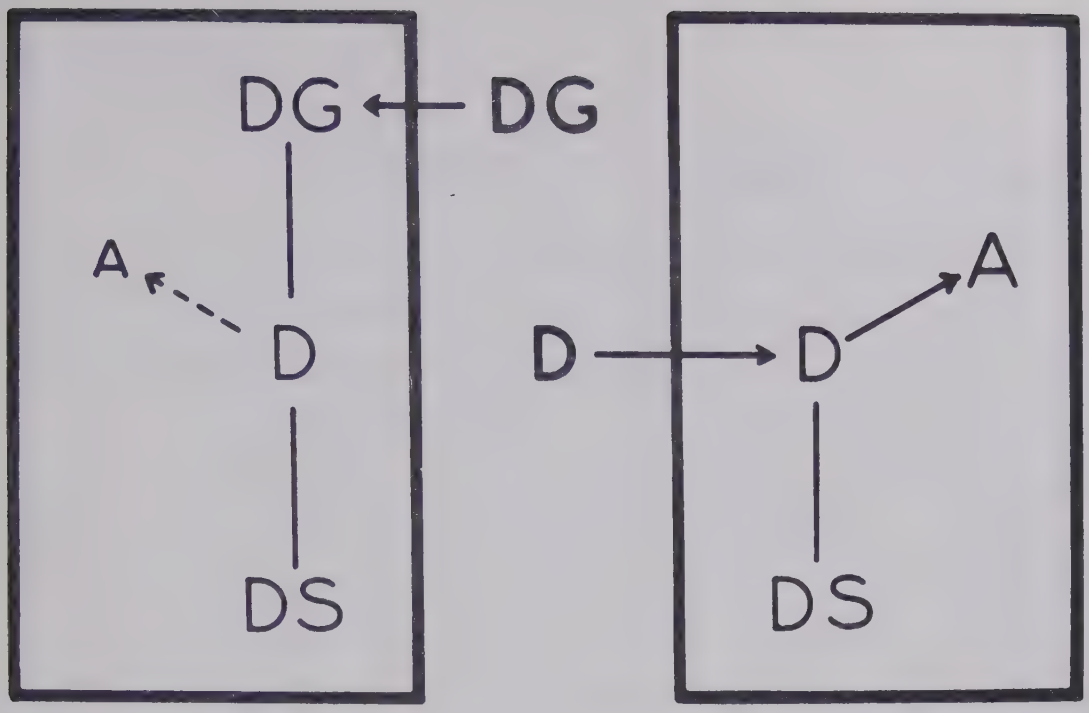


Figure .14.

Formation d'androstérone et de sulfate de déhydroépiandrostérone à partir du glucuronide de déhydroépiandrostérone : modèle à deux compartiments.

Cette représentation est basée sur :

1 : Un modèle à deux compartiments, les métabolismes du glucuronide de déhydroépiandrostérone (DG) et de la déhydroépiandrostérone (D) se déroulent dans deux compartiments séparés.

2 : Une hydrolyse métabolique du glucuronide de déhydroépiandrostérone comme première étape de la formation des métabolites considérés.
Dans le compartiment du glucuronide de déhydroépiandrostérone la déhydroépiandrostérone libérée donne moins d'androstérone (A) (pointillé) que la déhydroépiandrostérone dans le compartiment de la déhydroépiandrostérone (trait plein), relativement à la formation de sulfate de déhydroépiandrostérone (DS) dans les deux compartiments.

5 - La formation du sulfate de déhydroépiandrostérone.

Du sulfate de déhydroépiandrostérone est formé à partir du glucuronide de déhydroépiandrostérone. Le changement de conjugaison semble impliquer le passage par la déhydroépiandrostérone libre. Si le métabolisme survient dans un compartiment unique, les métabolites de la déhydroépiandrostérone libre et de la déhydroépiandrostérone résultant de la rupture de la liaison osidique devraient avoir le même R; comme l'androstérone a la plus petite valeur de R (0,1) de tous les métabolites du glucuronide de déhydroépiandrostérone, l'hydrolyse du glucuronide de déhydroépiandrostérone ne devrait pas dépasser 10 p.cent. Puisque le R du sulfate de déhydroépiandrostérone est beaucoup plus grand (0,8), un mécanisme supplémentaire doit être évoqué pour sa formation. Les deux possibilités les plus simples sont les suivantes :

A - "Compartiments métaboliques" : dans son compartiment, la déhydroépiandrostérone donne du sulfate de déhydroépiandrostérone et de l'androstérone; dans un compartiment séparé, le glucuronide de déhydroépiandrostérone est hydrolysé, et la déhydroépiandrostérone libérée donne un peu d'androstérone et beaucoup de sulfate de déhydroépiandrostérone par comparaison avec le compartiment de la déhydroépiandrostérone libre (Fig. 14). C'est l'équivalent d'une "transconjugaison" du glucuronide de déhydroépiandrostérone déterminée par l'existence de compartiments métaboliques.

B - "Transconjugaison chimique" : il n'y a pas de rupture de la liaison osidique. Le glucuronide de déhydroépiandrostérone donne du sulfate de déhydroépiandrostérone par remplacement du glucuronide par un ester-sulfate, sous l'action d'un enzyme de transfert hypothétique (Fig. 15); thermodynamiquement la transconjugaison du glucuronide de déhydroépiandrostérone en sulfate de déhydroépiandrostérone est concevable. Il n'existe pas de description de transconjugaison chimique à cette date. D'autre part, la transconjugaison inverse, du sulfate en glucuronide de déhydroépiandrostérone, ne semble pas se produire; en effet, après injection de sulfate de déhydroépiandrostérone-^{3}H et de déhydroépiandrostérone-^{14}C, le rapport $^{3}H/^{14}C$ est identique dans le glucuronide de déhydroépiandrostérone, l'androstérone et la 5β-androstérone urinaires (42).

Dans cette hypothèse de transconjugaison chimique, la formation d'androstérone à partir du glucuronide de déhydroépiandrostérone s'opère par un des types de "métabolisme initialement direct" précédemment décrits (Fig. 13 et 15, voies b et e), ou encore à titre de "métabolisme ultérieur" du sulfate de déhydroépiandrostérone formé.

Des situations encore plus complexes pourraient se concevoir. Dans l'hypothèse de deux compartiments métaboliques, une faible entrée de glucuronide de déhydroépiandrostérone pourrait se faire dans le compartiment de la déhydroépiandrostérone, et un transfert de déhydroépiandrostérone dans le

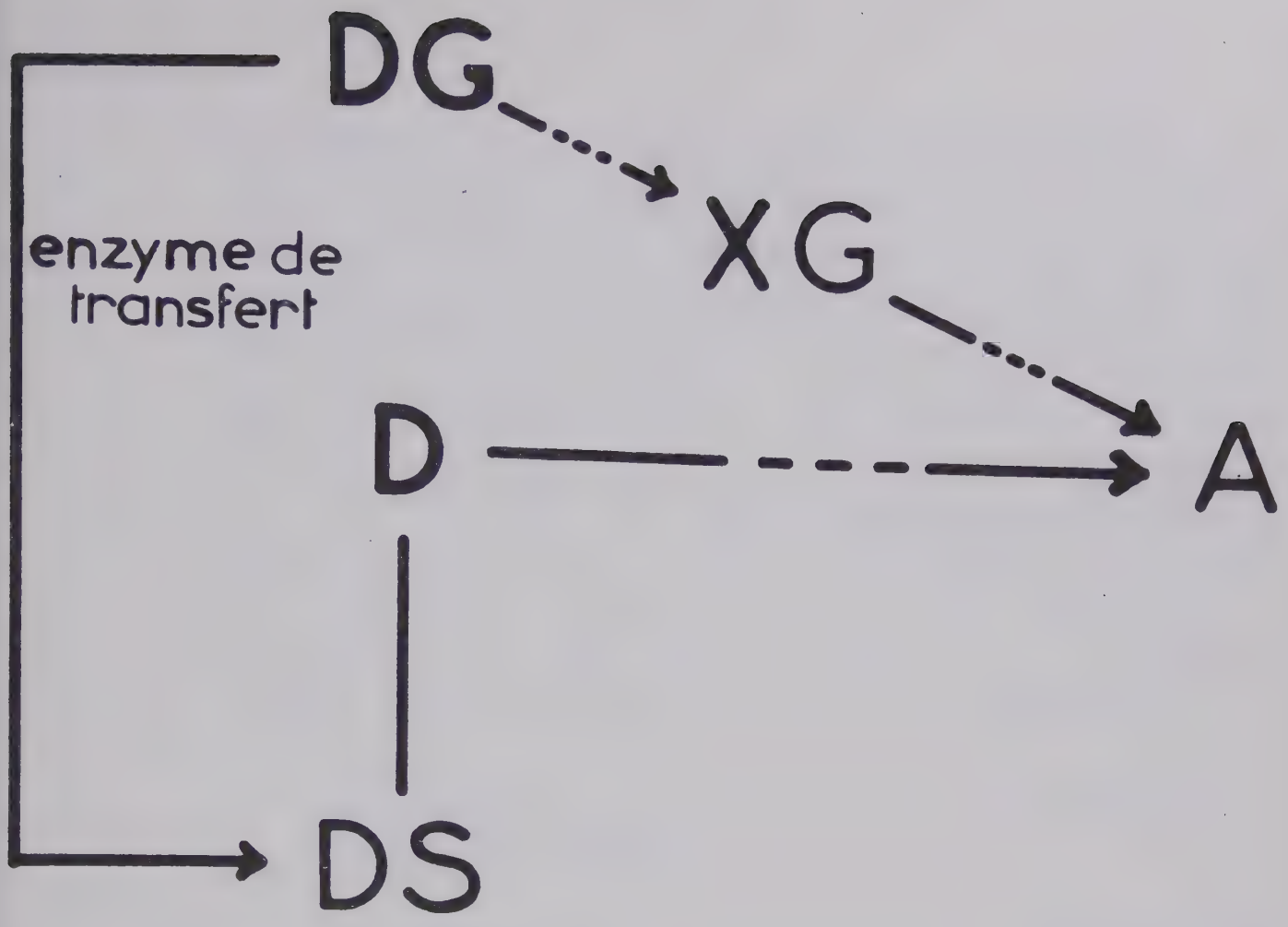


Figure .15.

Formation d'androstérone et de sulfate de déhydroépiandrostérone à partir du glucuronide de déhydroépiandrostérone : "transconjugaison chimique".

Cette représentation est basée sur :

1 : Un modèle à un seul compartiment.

2 : L'absence d'hydrolyse du glucuronide de déhydroépiandrostérone (DG).

3 : La transconjugaison du glucuronide de déhydroépiandrostérone en sulfate de déhydroépiandrostérone (DS), sans formation de déhydroépiandrostérone libre.

4 : La formation d'androstérone (A), à partir du glucuronide de déhydroépiandrostérone, par une voie métabolique initialement directe (XG).

compartiment du glucuronide de déhydroépiandrostérone, ou même un transfert de déhydroépiandrostérone libérée de sa liaison osidique dans le compartiment de la déhydroépiandrostérone; toutefois, le phénomène fondamental resterait l'existence de deux compartiments. S'il y a transconjugaison chimique, une hydrolyse partielle du glucuronide de déhydroépiandrostérone pourrait expliquer la formation d'androstérone selon une voie classique. Enfin compartiments et transconjugaison pourraient coexister. En termes de physiologie, le résultat net sera toujours le même, c'est à dire une contribution, différente de la déhydroépiandrostérone libre et libérée au sulfate de déhydroépiandrostérone et à l'androstérone.

C - Discussion de la mesure du taux de production de la déhydroépiandrostérone.

La "transconjugaison" du glucuronide de déhydroépiandrostérone, quel qu'en soit ne mécanisme, est théoriquement en contradiction avec une des propositions du modèle utilisé par Gurpide pour calculer les taux de production et d'interconversion du sulfate de déhydroépiandrostérone et de la déhydroépiandrostérone, connaissant les activités spécifiques du sulfate et du glucuronide de déhydroépiandrostérone urinaires après injection de déhydroépiandrostérone et de sulfate de déhydroépiandrostérone radioactifs. Toutefois, si l'on prend la valeur maxima du facteur de conversion du glucuronide de déhydroépiandrostérone en épiandrostérone (R du sulfate de déhydroépi-

androstérone = 0,8), il résulte que la quantité de déhydroépiandrostérone provenant du glucuronide de déhydroépiandrostérone est : taux de production du glucuronide de déhydroépiandrostérone x R = 0,7 x 0,8 = 0,6 mg/24 H. Comme le facteur de conversion de la déhydroépiandrostérone en sulfate de déhydroépiandrostérone est approximativement de 0,5 (3, 31), environ 0,3 mg/24 heures de sulfate de déhydroépiandrostérone proviennent du métabolisme du glucuronide. Le calcul demeure valable, même si la "transconjugaison" du glucuronide en sulfate de déhydroépiandrostérone survient sans formation de déhydroépiandrostérone libre. Ces valeurs sont faibles par rapport aux valeurs connues des taux de production du sulfate de déhydroépiandrostérone et ne semblent pas capables d'invalider, chez des sujets normaux, le modèle utilisé par Gurpide et coll (31).

Le métabolisme du glucuronide de déhydroépiandrostérone semble donc essentiellement caractérisé par une "transconjugaison", sur le plan physiologique. Un métabolisme direct est fortement suggéré par l'existence de glucuronides de 3β-hydroxystéroides. L'hydrolyse du glucuronide de déhydroépiandrostérone in vivo est possible mais n'est pas formellement démontrée, même en présence de nombreux 3α-hydroxy-métabolites. Les études du métabolisme qui emploient l'injection intraveineuse de stéroides radioactifs devraient tenir compte, avant de conclure, de toutes les inconnues auxquelles il a été fait allusion.

C H A P I T R E . VI.

METABOLISME DU GLUCURONIDE D'EPIANDROSTERONE-7α-^{3}H (o)

Les glucuronides de déhydroépiandrostérone et de testostérone sont des glucuronides d'hormones (ou tout au moins de produits de secrétion des glandes endocrines). Il a paru important de savoir si le "métabolisme ultérieur" des glucuronides de stéroides était une particularité des stéroides hormonaux, ou s'il pouvait aussi affecter les glucuronides de métabolites. Le glucuronide d'androstérone n'est pas métabolisé in vivo chez l'homme (56). Par contre le 16-glucuronide d'oestriol peut être converti en 3-glucuronide et en 3-sulfate d'oestriol, mais on n'observe pas de modification du stéroide (29). L'épiandrostérone a été choisie pour cette étude parce qu'elle est comme la déhydroépiandrostérone un 3β-hydroxystéroide, et parce que les études métaboliques réalisées avec l'épiandrostérone et le sulfate d'épiandrostérone avaient montré la formation d'androstérone (3).

Ce travail montre que 14 p.cent seulement du glucuronide d'épiandrostérone radioactif, administré à un taux physiologique, sont excrétés inchangés et qu'il existe un métabolisme ultérieur du glucuronide d'épiandrostérone. Les résultats sont

---

(o) : Ce travail a été réalisé sous notre direction par A. Alberga.

en faveur d'un métabolisme partiellement "direct", sans rupture de la liaison osidique et principalement "indirect", impliquant une hydrolyse du glucuronide. De plus, le taux de formation du sulfate d'épiandrostérone à partir du glucuronide d'épiandrostérone (par comparaison avec le sulfate d'épiandrostérone formé à partir de l'épiandrostérone) ne peut s'expliquer que par une "transconjugaison" qui pourrait être soit "chimique" ou seulement "physiologique".

Comme nous ne disposions que d'épiandrostérone-7α-^{3}H, l'étude comparative du métabolisme de l'épiandrostérone et du glucuronide d'épiandrostérone a été réalisée en deux expériences séparées (expériences 10 et 11) chez un même homme jeune normal.

Les urines des quatre jours suivant l'injection ont été soumises à l'hydrolyse séquentielle sélective, et les stéroides des fractions sulfate et glucuronide ont été séparés par le réactif T de Girard en stéroides cétoniques et non cétoniques.

I - Métabolisme de l'épiandrostérone-7α-^{3}H (Expérience 10).

Dans cette expérience 7,0 µcuries d'épiandrostérone-7α-^{3}H et 2,8 µcuries de testostérone-4-^{14}C avaient été injectées par voie intraveineuse (Tableau IV). Seuls les métabolites cétoniques ont été étudiés. Les résultats sont représentés Tableau XXVIII.

T A B L E A U .XXVIII.

INJECTION INTRAVEINEUSE D'EPIANDROSTERONE-^{3}H ET DE TESTOSTERONE-^{14}C A UN HOMME NORMAL.

(Expérience 10)

Métabolites urinaires[2]	conversion[1] de l'épiandrostérone-^{3}H	conversion de la testostérone-^{14}C
Androstérone (glucuronide)	10,3	11,5
Androstérone (sulfate)	2,1	2,6
Epiandrostérone (glucuronide)	$\leqslant$ 0,2[4]	$<$ 0,1
Epiandrostérone (sulfate)	5,6	0,7
5β-androstérone (glucuronide)	-[3]	13,0
5β-androstérone (sulfate)	-	1,8

Taux de production de l'épiandrostérone (mg/24 heures) = 5,6

1 : Pourcentage de conversion du composé injecté en le métabolite urinaire.
2 : Métabolites isolés après hydrolyse sélective des sulfates et glucuronides (Chap. I, 1)
3 : Non mesurable
4 : Valeur maxima car le métabolite n'a pas été purifié de façon rigoureuse.

1 - L'épiandrostérone dans la fraction sulfate.

Les "sulfates cétoniques" ont été chromatographiés dans le système E; deux zones radioactives ont été détectées, la moins polaire correspondait à l'androstérone, la plus polaire à la 5β-androstérone et à l'épiandrostérone radioactives. Les tubes de cette zone polaire ont été rassemblés et la chromatographie dans le système A a permis de séparer l'épiandrostérone et la 5β-androstérone. Cette dernière n'était marquée que par le ^{14}C. L'identité de l'épiandrostérone a été confirmée par chromatographie dans le système F. La réaction à l'acide métachloroperbenzoïque a été effectuée, et après chromatographie dans le système D, le seul pic radioactif avait la polarité de l'épiandrostérone avec un rapport $^{3}H/^{14}C$ inchangé. La cristallisation après dilution isotopique a montré l'identité des activités spécifiques des cristaux et de l'eau-mère.

2 - L'androstérone dans la fraction glucuronide.

La chromatographie dans le système E des "glucuronides cétoniques" a montré trois pics radioactifs correspondant dans l'ordre des polarités croissantes à l'androstérone, à la 5β-androstérone + l'épiandrostérone et enfin à la testostérone. Les tubes de la première fraction correspondant à l'androstérone ont été rassemblés et la chromatographie dans les systèmes

A, F, D, suivie de cristallisation après dilution isotopique par le composé de référence a confirmé l'identité de l'androstérone.

3 - L'épiandrostérone dans la fraction glucuronide.

La fraction de la chromatographie dans le système E correspondant à la 5β-androstérone et à l'épiandrostérone a été chromatographiée dans le système A. Une zone radioactive ayant la polarité de l'épiandrostérone a été détectée, mais l'identification n'a pu être poursuivie. La zone de la 5β-androstérone était marquée uniquement par le ^{14}C.

II - Métabolisme du glucuronide d'épiandrostérone-7α-^{3}H (Expérience 11).

Dans cette expérience 6,5 µcuries de glucuronide d'épiandrostérone-7α-^{3}H et 0,25 µcurie de 4-androstène-3,17-dione-4-^{14}C ont été administrées au même sujet que dans l'expérience 10 (Tableau IV). Les résultats sont représentés Tableau XXIX.

1 - L'épiandrostérone dans la fraction glucuronide.

Les "glucuronides cétoniques" ont été chromatographiés dans le système E. Deux zones radioactives, contenant à la fois du ^{3}H et du ^{14}C ont été détectées. Les tubes de la zone la plus polaire ont été rassemblés et chromatographiés dans le système A. Deux composés radioactifs ont été isolés. Le plus

T A B L E A U .XXIX.

INJECTION INTRAVEINEUSE DE GLUCURONIDE D'EPIANDROSTERONE-^{3}H ET DE 4-ANDROSTENEDIONE-^{14}C A UN HOMME NORMAL.

(Expérience 11)

Métabolites urinaires[2]	conversion[1] du glucuronide d'épiandrostérone-^{3}H	conversion de la 4-androstènedione-^{14}C
Androstérone (glucuronide)	2,0	7,7
Androstérone (sulfate)	0,6	3,7
Epiandrostérone (glucuronide)	14,2	-[3]
Epiandrostérone (sulfate)	2,6	1,0
5β-androstérone (glucuronide)	-	6,4
5β-androstérone (sulfate)	-	1,8
Androstane-3β,17β-diol (glucuronide)	6,7	-

Taux de production du glucuronide d'épiandrostérone (mg/24 heures) = 0,2

1 : Pourcentage de conversion du composé injecté en le métabolite urinaire.
2 : Métabolites isolés après hydrolyse sélective des sulfates et glucuronides (Chap. I, 1).
3 : Non mesurable.

polaire, correspondant à la 5β-androstérone, était marqué uniquement par le ^{14}C. Le moins polaire était marqué uniquement par le ^{3}H. Son identité a été confirmée par cristallisation après dilution isotopique.

2 - L'androstérone dans la fraction glucuronide.

Le pic le moins polaire de la chromatographie des "glucuronides cétoniques" dans le système E correspondait à l'androstérone. Son identité a été confirmée par chromatographie dans le système A suivie de cristallisation après dilution isotopique.

3 - L'épiandrostérone dans la fraction sulfate.

Les "sulfates cétoniques" ont été chromatographiés dans le système E, ce qui a permis de séparer deux zones, contenant à la fois du ^{3}H et du ^{14}C. Les tubes de la zone la plus polaire ont été rassemblés et rechromatographiés dans le système A. Deux composés radioactifs ont été isolés. Le plus polaire, correspondant à la 5β-androstérone, était marqué uniquement par le ^{14}C. Le moins polaire, contenant à la fois du ^{14}C et du ^{3}H, correspondait à l'épiandrostérone. Son identité a été confirmée par chromatographie dans les systèmes F et P, suivie de cristallisation après dilution isotopique par le composé de référence. Un aliquote du seul pic radioactif obtenu dans le système P a été traité par l'acide méta-

chloroperbenzoïque. Le seul composé radioactif obtenu par chromatographie dans le système D avait la polarité de l'épiandrostérone, et le rapport $^{14}C/^{3}H$ était inchangé.

4 - Le 5α-androstane-3β,17β-diol dans la fraction glucuronide.

La chromatographie dans le système B des "glucuronides non cétoniques" a révélé trois fractions radioactives. La moins polaire était marquée uniquement par le ^{3}H, la plus polaire par le ^{14}C. La plus importante, qui contenait à la fois du ^{3}H et du ^{14}C, avait la migration des 5α-androstane-3α et 3β,17β-diols dans ce système. La chromatographie dans le système G a montré deux composés radioactifs; le plus polaire, marqué uniquement par le ^{3}H, correspondait à l'androstane-3β,17β-diol; le moins polaire, marqué à la fois par le ^{3}H et le ^{14}C correspondait à l'androstane-3α,17β-diol. Leur identification n'a pas été poursuivie.

DISCUSSION

1 - Métabolisme "ultérieur" du glucuronide d'épiandrostérone.

Comme les glucuronides de testostérone et de déhydroépiandrostérone, et contrairement au glucuronide d'androstérone

(56), le glucuronide d'épiandrostérone est métabolisé; 14 p. cent de la radioactivité injectée sont retrouvés inchangés dans l'urine; le fait qu'il ne s'agit pas d'un phénomène d'excrétion mais bien d'un métabolisme est attesté par la présence de plusieurs métabolites radioactifs urinaires, sulfate d'épiandrostérone, androstérone et androstane-3β,17β-diol. Les métabolites isolés conservent la structure 5α-stéroide qui est une caractéristique chimique irréversible. Le métabolisme ultérieur de métabolites conjugués avait déjà été démontré pour le sulfate d'épiandrostérone-^{3}H, alors qu'il n'avait pu être mis en évidence de façon certaine après l'injection des sulfates de 5α- et 5β-androstérone (3). Il semble donc que la structure 3β-hydroxystéroide favorise le métabolisme ultérieur d'un métabolite conjugué, peut-être en permettant l'hydrolyse in vivo du conjugué. Cependant la stéréo-spécificité, bien connue pour les sulfatases, n'a pas été jusqu'à présent observée pour les β-glucuronidases, quelle qu'en soit l'origine (digestive, bactérienne ou hépatique).

Le taux de production du glucuronide d'épiandrostérone endogène (exprimé en épiandrostérone) est très faible (de l'ordre de 0,2 mg/24 heures). Le taux de production de l'épiandrostérone mesuré chez le même sujet est de 5,6 mg/24 heures. On peut donc estimer à environ 4 p.cent la conversion métabolique de l'épiandrostérone en glucuronide d'épiandrostérone. Ceci confirme que l'épiandrostérone est essentiellement sulfoconjuguée chez l'homme (3).

2 - Formation du glucuronide de 5α-androstane-3β,17β-diol.

Ce composé n'est pas excrété normalement dans l'urine en quantité détectable. Après injection simultanée de glucuronide d'épiandrostérone-^{3}H et d'androstènedione-^{14}C, le glucuronide d'androstane-3β,17β-diol était marqué uniquement par le ^{3}H. Il est donc vraisemblable qu'il s'agisse d'un 3β-yl glucuronide, résultant de l'action d'une 17β-hydroxystéroide deshydrogénase sur le glucuronide d'épiandrostérone. Une telle conclusion est étayée par les résultats analogues obtenus après injection du glucuronide de déhydroépiandrostérone-^{3}H et après incubation in vitro de 3β-yl glucuronide de 5β-androstanediol avec la β-hydroxystéroide déshydrogénase de Pseudomonas Testosteroni (Chap. V, Discussion, 2).

3 - Formation du sulfate et du glucuronide d'androstérone.

Le passage de la structure 3β-hydroxystéroide qui est celle de l'épiandrostérone à la structure 3α-hydroxystéroide qui est celle de l'androstérone implique tôt ou tard une hydrolyse du glucuronide, une oxydation par une 3-céto-5α-stéroide oxydoréductase, suivie d'une réduction en position 3α-OH (voir Fig. 12, Chap. V). Si l'on rassemble de façon arbitraire les résultats des expériences 10 et 11, il est possible de calculer un R défini comme le rapport des taux de conversion du glucuronide d'épiandrostérone et de l'épiandro-

stérone pour chacun des métabolites communs à ces deux précurseurs (Chap. I, 4, et Tableau XXX). Ce "facteur de conversion" pourrait avoir une signification physiologique dans la mesure où les deux expériences, ayant été réalisées chez le même individu, il semble légitime d'admettre que le métabolisme soit demeuré sensiblement constant. Dans ces conditions le R de l'androstérone montre une hydrolyse du glucuronide d'épiandrostérone de 20 p.cent dans le "compartiment métabolique général". On ne peut exclure cependant que le métabolisme du glucuronide d'épiandrostérone et de l'épiandrostérone se soit déroulé dans des compartiments différents, pour les raisons déjà discutées Chapitres III (Discussion, 1) et V (Discussion, 2); on ne peut exclure également que le passage du glucuronide d'épiandrostérone à l'androstérone se soit effectué par des voies détournées : soit par l'intermédiaire du glucuronide d'androstane-3β,17β-diol et formation éventuelle d'un diconjugué (par analogie avec la voie a, Fig. 13, Chap. V); soit par l'intermédiaire de la formation d'un 3-énol glucuronide d'épiandrostérone (par analogie avec la voie e, Fig. 13, Chap. V). Ces possibilités sont strictement spéculatives et beaucoup plus improbables que l'hydrolyse directe du glucuronide d'épiandrostérone.

T A B L E A U .XXX.

INJECTION INTRAVEINEUSE D'EPIANDROSTERONE-^{3}H (Expérience 10) ET DE GLUCURONIDE D'EPIANDROSTERONE-^{3}H (Expérience 11) A UN HOMME NORMAL

Métabolites urinaires[2]	conversion[1] de l'épiandrostérone-^{3}H	conversion du glucuronide d'épiandrostérone-^{3}H	R[3]
Androstérone (sulfate + glucuronide)	12,4	2,6	0,21
Epiandrostérone (sulfate)	5,6	2,6	0,46
Epiandrostérone (glucuronide)	$\leqslant$ 0,2[4]	14,2	71

1 : Pourcentage de conversion du composé injecté en le métabolite urinaire.
2 : Métabolites isolés après hydrolyse sélective des sulfates et glucuronides (Chap. I, 1).
3 : Rapport des taux de conversion du glucuronide d'épiandrostérone et de l'épiandrostérone en le métabolite considéré. Pour ce calcul on a supposé que les deux composés ont été injectés simultanément.
4 : Valeur maxima car le métabolite n'a pas été purifié de façon rigoureuse.

4 - Formation du sulfate d'épiandrostérone.

La mise en évidence dans les urines de sulfate d'épiandrostérone-^{3}H semble impliquer une hydrolyse du glucuronide d'épiandrostérone-^{3}H suivie d'une reconjugaison de l'épiandrostérone-^{3}H libérée. Si l'on prend en considération le R de l'androstérone, la valeur maxima de l'hydrolyse du glucuronide d'épiandrostérone dans le "compartiment métabolique général" est de 0,21 (Tableau XXX). Comme le R du sulfate d'épiandrostérone est plus de deux fois supérieur (0,46), deux sortes d'explications peuvent être envisagées (voir Chap. V, Discussion 5).

A - "Compartiments du métabolisme" : le glucuronide d'épiandrostérone et l'épiandrostérone entrent dans des compartiments métaboliques séparés, où chacun d'eux donne du sulfate d'épiandrostérone et de l'androstérone, dans un rapport de conversion différent (situation analogue à celle décrite Chap. V, Fig. 14).

B - "Transconjugaison chimique" : la formation de sulfate d'épiandrostérone se ferait directement, sans passage par l'épiandrostérone libre, sous l'action d'un "enzyme de transfert" hypothétique (situation analogue à celle qui est décrite Chap. V, Fig. 15).

Cependant des situations encore plus complexes peuvent se concevoir. L'épiandrostérone pourrait aussi être en partie transférée du compartiment du glucuronide d'épiandrostérone au compartiment de l'épiandrostérone, et inversement. D'autre part la formation du sulfate d'épiandrostérone pourrait être la conséquence d'un métabolisme "initialement direct" du glucuronide d'épiandrostérone, par l'intermédiaire d'un 3-sulfate,17-glucuronide d'androstane-3β,17β-diol (situation analogue à celle représentée Chap. IV, Fig. 7, et Chap. V, Fig. 13, a).

Interprétées en termes physiologiques, ces différentes possibilités auront toujours la même signification, celle d'une "transconjugaison".

RESUME ET CONCLUSIONS

Les glucuronides de testostérone, de déhydroépiandrostérone et d'épiandrostérone radioactifs ont été synthétisés et administrés à des sujets normaux à des doses compatibles avec le maintien de l'équilibre physiologique.

Les glucuronides de testostérone et de déhydroépiandrostérone, glucuronides d'hormones, et le glucuronide d'épiandrostérone, glucuronide de métabolite, sont métabolisés : une faible part (15 p.cent environ) de la radioactivité injectée est retrouvée inchangée dans les urines. Ainsi il n'est plus possible de maintenir la conception selon laquelle la glucuroconjugaison constitue un processus ultime de détoxication des hormones stéroides.

Plusieurs métabolites urinaires du glucuronide de testostérone ont été isolés ; fait remarquable, seuls des 5β-androstane stéroides ont été observés alors que la testostérone injectée simultanément donnait aussi des 5α-métabolites. En conséquence, le clivage métabolique du glucuronide de testostérone semble improbable, à moins qu'il ne survienne dans un "organe" indéterminé où la testostérone ne donne pas de 5α-stéroides.

Le glucuronide de déhydroépiandrostérone donne plusieurs glucuronides de 3β-hydroxy stéroides urinaires, ce qui indique la possibilité d'une 17β-hydrogénation et d'une Δ5-6-réduction

du glucuronide de déhydroépiandrostérone administré. Les glucuronides de déhydroépiandrostérone et d'épiandrostérone donnent lieu également à la formation de 3α-hydroxystéroides, notamment d'androstérone. Rapportée à une production égale d'androstérone, la contribution du glucuronide de déhydroépiandrostérone (ou d'épiandrostérone) au sulfate de déhydroépiandrostérone (ou d'épiandrostérone) urinaire est significativement supérieure à la contribution du stéroide libre correspondant ; une transconjugaison "physiologique" est ainsi démontrée. Son mécanisme biochimique est discuté.

La synthèse et l'administration de glucuronide-^{14}C de testostérone-^{3}H ont permis de démontrer rigoureusement l'existence d'un métabolisme direct de glucuronide de stéroide, sans rupture de la liaison osidique. Les résultats suggèrent fortement qu'un tel "métabolisme direct" existe également pour les glucuronides de déhydroépiandrostérone et d'épiandrostérone. Ces faits amènent à postuler l'existence d'enzymes (3-céto-5β-stéroide-Δ4-deshydrogenase, 3α-hydroxy-stéroide deshydrogenase, 17β-hydroxystéroide deshydrogenase) acceptant des glucuronides de stéroides pour substrats.

Le métabolisme de la testostérone, de la déhydroépiandrostérone et de l'épiandrostérone diffère considérablement du métabolisme de leurs glucuronides respectifs ; l'hydrosolubilité et l'acidité de ces derniers influent grandement sur le destin de la copule stéroide. Il semble même qu'un stéroide libre puisse avoir un métabolisme quantitativement différent selon son origine. La notion de "compartiments du métabolisme"

semble expliquer au mieux le "5β-métabolisme sélectif" du glucuronide de testostérone, ainsi que la "transconjugaison" des glucuronides de déhydroépiandrostérone et d'épiandrostérone. L'existence de tels compartiments du métabolisme risque de rendre impossible le mélange homogène des traceurs administrés in vivo et des stéroides endogènes correspondants, et ainsi d'enlever de sa signification à la mesure des taux de production et d'interconversion des androgènes.

Au cours de cette étude, il a été vérifié que le glucuronide de testostérone urinaire a principalement sinon exclusivement, la structure 17β-yl-β-D glucopyranuronoside, qui est celle du composé administré.

Enfin il a été calculé que 5 à 10 p.cent de la testostérone et de la déhydroépiandrostérone produites dans l'organisme sont directement glucuro-conjugués préalablement à toute transformation métabolique.

En conclusion, les glucuronides des androgènes sont métabolisés. La question est ouverte de savoir si ce métabolisme a une signification physiologique, notamment en ce qui concerne le transport des hormones stéroides et leur activité biologique au niveau de récepteurs privilégiés.

D'autre part l'emploi de ces composés semble prometteur pour l'étude de problèmes généraux du métabolisme des stéroides, tels que la perméabilité des membranes biologiques, la spécificité et l'affinité des enzymes.

REFERENCES

1. Baulieu, E.-E.
Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris), 251, 1421 (1960)

2. Baulieu, E.-E., Corpéchot, C. et Emiliozzi, R.
Steroids, 2, 429 (1963)

3. Baulieu, E.-E., Corpéchot, C., Dray, F., Emiliozzi, R., Lebeau, M.-Cl., Mauvais-Jarvis, P. et Robel, P.
Rec. Progr. Hormone Res., 21, 411 (1965)

4. Baulieu, E.-E. et Dray, F.
J. Clin. Endocrinol. and Metab., 23, 1298 (1963)

5. Baulieu, E.-E. et Emiliozzi, R.
Bull. Soc. Chim. Biol., 44, 823 (1962)

6. Baulieu, E.-E. et Mauvais-Jarvis, P.
J. Biol. Chem., 239, 1569 (1964)

7. Baulieu, E.-E. et Mauvais-Jarvis, P.
J. Biol. Chem., 239, 1578 (1964)

8. Baulieu, E.-E. et Michaud, G.
Bull. Soc. Chim. Biol., 43, 885 (1961)

9. Baulieu, E.-E., Michaud, G. et Benhamou, R.
C. R. Soc. Biol., 155, 1003 (1961)

10. Baulieu, E.-E., Michaud, G. et Corpéchot, C.
Ann. Biol. Clin. (Paris), 19, 291 (1961)

11. Baulieu, E.-E. et Robel, P.
Steroids, 2, 111 (1963)

12. Bradlow, H.L., Fukushima, D.K., Zumoff, B., Hellman, L. et Gallagher, T.F.
Acta Endocrinol., 45, 26 (1964)

13. Bongiovanni, A.M. et Eberlein, W.R.
J. Clin. Endocrinol. and Metab., 17, 238 (1957)

14. Bongiovanni, A.M., Eberlein, W.R. et Thomas, P.Z.
J. Clin. Endocrinol. and Metab., 17, 331 (1957)

15. Burger, H.G., Kent, J.R. et Kellie, A.E.
J. Clin. Endocrinol. and Metab., 24, 432 (1964)

16. Burstein, S. et Lieberman, S.
J. Biol. Chem., 233, 331 (1959)

17. Calvin, H.I., Vande Wiele, R.L. et Lieberman, S.
Biochemistry, 2, 648 (1963)

18. Camacho, A. et Migeon, C.J.
J. Clin. Endocrinol. and Metab., 23, 301 (1963)

19. Cavina, C. et Tentori, L.
Clin. Chim. Acta, 3, 160 (1958)

20. Cédard, L., Yannotti, S. et Varangot, J.
C. R. Soc. Biol., 155, 458 (1961)

21. Cohn, G.L., Bondy, P.K. et Castiglione, C.
J. Clin. Invest., 40, 400 (1961)

22. Cox, P.A. et Kellie, A.E.
1st Inter. Congress on Hormonal Steroids, Academic Press, 2, 575 (1965)

23. Edwards, R.W.H. et Kellie, A.E.
Chem. and Ind. (London), 250 (1956)

24. Edwards, R.W.H., Kellie, A.E. et Wade, A.P.
Mem. Soc. Endocrinol., 2, 53 (1953)

25. Emiliozzi, R.
Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris), 258, 3875 (1964)

26. Fishman, W.H. et Sie, H.G.
J. Biol. Chem., 218, 335 (1956)

27. Forchielli, E. et Dorfman, R.I.
J. Biol. Chem., 223, 443 (1956)

28. Goebel, W.F. et Babers, F.H.
J. Biol. Chem., 111, 347 (1935)

29. Goebelsmann, U., Eriksson, G., Wiqvist, N. et Diczfalusy,E.
Acta Endocrinol., 50, 261 (1965)

30. Grajier, D. et Idler, D.R.
Can. J. Biochem. and Physiol., 41, 23 (1963)

31. Gurpide, E., Macdonald, P.C., Vande Wiele, R.L. et Lieberman, S.
J. Clin. Endocrinol. and Metab., 23, 346 (1963)

32. Gurpide, E., Macdonald, P.C., Chapdelaine, A., Vande Wiele, R.L. et Lieberman, S.
J. Clin. Endocrinol. and Metab., 25, 1537 (1965)

33. Hadd, H.E. et Rhamy, R.K.
J. Clin. Endocrinol. and Metab., 25, 876 (1965)

34. Horton, R. et Tait, J.F.
J. Clin. Invest., 45, 301 (1966)

35. Kawahara, I.S., Wang, S.F. et Talalay, P.
J. Biol. Chem., 237, 1500 (1962)

36. Kellie, A.E.
J. Endocrinol., 22, i (1961)

37. Kellie, A.E. et Smith, E.R.
Biochem. J., 66, 490 (1957)

38. Kellie, A.E. et Wade, A.P.
Biochem. J., 66, 196 (1957)

39. Koenig, W. et Knorr, E.
Ber.Deut. Chem. Ges., 34, 957 (1901)

40. Korenman, S.G. et Lipsett, M.B.
J. Clin. Invest., 43, 2125 (1964)

41. Lakshmanan, T.K. et Lieberman, S.
Arch. Biochem. Biophys., 53, 258 (1954)

42. Macdonald, P.C., Chapdelaine, A., Gonzalez, O., Gurpide, E., Vande Wiele, R.L. et Lieberman, S.
J. Clin. Endocrinol. and Metab., 25, 1557 (1965)

43. Macdonald, P.C., Vande Wiele, R.L. et Lieberman, S.
J. Clin. Endocrinol. and Metab., 22, 1222 (1962)

44. McGuire, J.S. et Tomkins, G.M.
Arch. Biochem. Biophys., 82, 477 (1959)

45. McKenna, J. et Norymberski, J.K.
Biochem. J., 76, 60P (1960)

46. Okita, G.T., Kabara, J.J., Richardson, F. et Leroy, G.V.
Nucleonics, 15, 111 (1957)

47. Pearlman, W.H.
Biochem. J., 67, 1 (1957)

48. Pradhan, S.K. et Ringold, H.J.
J. Org. Chem., 29, 601 (1964)

49. Roberts, K.D., Vande Wiele, R.L. et Lieberman, S.
J. Biol. Chem., 236, 2213 (1961)

50. Savard, K.
J. Biol. Chem., 202, 457 (1953)

51. Schneider, J.J. et Lewbart, M.L.
Rec. Progr. Hormone Res., 15, 201 (1959)

52. Schubert, K. et Wehrberger, K.
Naturwissenschaften, 47, 281 (1960)

53. Shapiro, E.
Nature, 142, 1036 (1939)

54. Siiteri, P.K.
Ph. D. Dissertation, Columbia University (1963)

55. Siiteri, P.K.
Steroids, 2, 687 (1963)

56. Siiteri, P.K. et Lieberman, S.
Biochemistry, 2, 1171 (1963)

57. Siiteri, P.K., Vande Wiele, R.L. et Lieberman, S.
J. Clin. Endocrinol. and Metab., 23, 588 (1963)

58. Sondheimer, F., Amendolla, C. et Rosenkrantz, C.
J. Am. Chem. Soc., 75, 5930 (1953)

59. Twombly, G.H. et Levitz, M.
Am. J. Obst. Gynecol., 80, 889 (1960)

60. Underwood, R.H. et Tait, J.F.
J. Clin. Endocrinol. and Metab., 24, 1110 (1964)

61. Vande Wiele, R.L., Macdonald, P.C., Bolté, E. et Lieberman, S.
Rec. Progr. Hormone Res., 19, 275 (1963)

62. Wotiz, H.H., Smakala, E., Lichtin, N.N. et Leftin, J.H.
J. Am. Chem. Soc., 81, 1704 (1959)

63. Wu, H.L.C. et Mason, M.
Steroids, 5, 45 (1965)

TABLE DES FIGURES

Numero		Page
0	Appareil pour gradient linéaire de polarité	12
1	Séparation des glucuronides d'androstérone, de 5β-androstérone et de testostérone	15
2	Signification physiologique du facteur de conversion (R)	20
3	Purification du méthyl triacétyl glucuronide de testostérone-7α-^{3}H	26
4	Schema du protocole analytique (Expériences 2,3,4)	44
5	5β-métabolisme sélectif du glucuronide de testostérone	61
6	Contribution respective de la testostérone et du glucuronide de testostérone à un métabolite urinaire	69
7	Essai de représentation du métabolisme du glucuronide-^{14}C de testostérone-^{3}H	74
8	Schema du protocole analytique (Expérience 7)	78
9	Séparation des glucuronides de 5β-androstanediol et de 5β-androstérone	84
10	Possible métabolisme direct du glucuronide de déhydroépiandrostérone (17β-réduction initiale)	118
11	Possible métabolisme direct du glucuronide de déhydroépiandrostérone (réduction initiale de la double liaison Δ4-5)	120
12	Possible métabolisme indirect du glucuronide de déhydroépiandrostérone	123

Numero		Page
13	Possibles voies métaboliques (initialement directes) entre le glucuronide de déhydro-épiandrostérone et les 5α et 5β-androstérone	125
14	Formation d'androstérone et de sulfate de déhydroépiandrostérone à partir du glucuronide de déhydroépiandrostérone : modèle à deux compartiments	127
15	Formation d'androstérone et de sulfate de déhydroépiandrostérone à partir du glucuronide de déhydroépiandrostérone : "transconjugaison chimique"	130

TABLE DES MATIERES

	Page
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : Méthodes et techniques	
1 - Recueil, extraction, hydrolyse, purification préliminaire des urines	7
2 - Systèmes de chromatographie	9
3 - Détection et identification	16
4 - Comptage et calculs	17
5 - Synthèse des glucuronides de stéroides radioactifs	21
CHAPITRE II : Structure du glucuronide de testostérone urinaire.	33
1 - Recherche de diglucuronide de testostérone urinaire	34
2 - Recherche de 3-énol glucuronide de testostérone urinaire	37
CHAPITRE III : Métabolisme du glucuronide de testostérone	
I - Les métabolites urinaires chez trois hommes normaux	40
II - Les métabolites urinaires chez une femme enceinte à terme	55
III - Les métabolites urinaires chez un enfant	58
Discussion :	
1 - Considérations qualitatives	60
2 - Considérations quantitatives	65
CHAPITRE IV : Métabolisme du glucuronide-6-^{14}C de testostérone-7α-^{3}H	73
Méthodes	75
Résultats	77
Discussion	89

CHAPITRE V : Le métabolisme du glucuronide de déhydroépiandrostérone-7α-^{3}H 96

Méthodes 97

Résultats 98

Discussion 115

CHAPITRE VI : Métabolisme du glucuronide d'épiandrostérone-7α-^{3}H 133

I - Métabolisme de l'épiandrostérone-7α-^{3}H 134

II - Métabolisme du glucuronide d'épiandrostérone-7α-^{3}H 137

Discussion 140

RESUME ET CONCLUSIONS 147

REFERENCES 151

TABLE DES FIGURES 156

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DES SCIENCES
DE PARIS

9, QUAI SAINT BERNARD - PARIS V^e

SERVICE DE LA SCOLARITÉ

Bureau des Enseignements du 3^e Cycle

TÉLÉPHONE : 336-25-25 - P

PERMIS D'IMPRIMER

DOCTORAT : D'UNIVERSITE

THESE DE :

Nom : ROBEL

Prénoms : Paul

Né (e) le 16 Septembre 1926 à PARIS 5ème Dép^t Seine

SUJETS

1ère THESE : " Métabolisme de glucuronides d'androgenes ."

2e THESE (Propositions faites par la Faculté) :
" Hormones participant à la régulation du Métabolisme hydro-hydromineral : Aldostérone et Vasopressine, Mécanismes d'action."

Vu et approuvé

Paris, le 19 Décembre 1967

Le Doyen de la Faculté
des Sciences de Paris

Vu et permis d'imprimer

Paris, le

Le Recteur de l'Académie
de Paris

Se. 3e c. 65-16